

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización molecular de cepas de mycobacterium
tuberculosis aislada de pacientes con fracaso
terapéutico mediante la técnica genotipaje basado en
PCR**

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo

AUTOR

Carlos Alberto Tello Ayllón

ASESOR

Nelly Borja Santa Cruz

Ruth García de la Guarda

Lima – Perú

2008

“Quiero recalcar algo más, un poco al margen del tema de este brindis: aunque lo exiguo de nuestras personalidades nos impide ser voceros de su causa, creemos, y después de este viaje más firmemente que antes, que la división de América en nacionalidades inciertas e ilusorias es completamente ficticia. Constituimos una sola raza mestiza que desde México hasta el estrecho de Magallanes presentando notables similitudes etnográficas. Por eso, tratando de quitarme toda carga de provincialismo exiguo, brindo por Perú y por América Unida”.
Ernesto Guevara de la Serna, Diarios de motocicleta.

*“Y aquí en el cielo de Sierra Maestra
Yo solo alcanzo a saludar la aurora
Porque se me hizo tarde en mis quehaceres,
Se me paso la vida en tantas cosas,
Que dejo mis trabajos a otras manos
Y mi canción la cantará otra boca.
Porque así se encadena la jornada
y floreciendo seguirá la rosa”. (ω-114)
Pablo Neruda, Meditación sobre Sierra Maestra*

Agradecimientos

La humildad de este trabajo quizás no merezca colocar los nombres que se mencionaran, que al margen del esfuerzo y calidad que se impuso, solo fueron usadas herramientas sencillas de lo cual se creo esta pequeña obra del cual me siento orgulloso. Pero en este recorrido incierto, del cual no tenía experiencia, hubo valioso apoyo del cual estaré infinitamente agradecido.

Ante todo, por la religión católica que profeso, debo agradecer a Nuestro Señor de los Cielos y a la Santísima Virgen Maria, fuente y guía de mi inspiración y de mi trabajo.

Mi agradecimiento a mis Padres, Maria Luisa Ayllón y Gillert Saúl Tello, por su inmenso apoyo, cariño y comprensión durante toda esta travesía que fue mi tesis

Agradezco a mis asesoras: La Dra Nelly Borja Santa Cruz jefa del Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen y docente de la Facultad de Medicina de San Fernando, la cual me brindo aquella luz en el camino de mi investigación cuando todo era oscuridad y enseñarme lo que significa el Impacto Social de la tuberculosis en el Perú, a la Mg. Ruth Garcia de la Guarda jefa del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Nacional Mayor San Marcos, de quien recibí el consejo, apoyo y respaldo mucho antes de empezar este periplo; ambas son mis maestras las cuales siempre mantendré mucho respeto y cariño por su sabiduría y comprensión hacia mi persona.

Quiero agradecer también a los doctores Raúl Diaz y a Ernesto Montoro del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri de Cuba, los cuales de alguna forma me instruyeron de principio a fin sobre una materia poco estudiada en el Perú, que es la epidemiología en relación a la enfermedad de la tuberculosis, y además brindándome información conocimientos y discusiones valiosas para este trabajo.

Tambien agradezo al Dr. Joaquim Ruiz del Hospital Clinic de Barcelona, quien me ayudo a ejecutar la discusión molecular con un mayor nivel científico, y a todos los investigadores con los cuales me comunique para obtener información.

Mi agradecimiento al Mg. Ronnie Gavilan, quien fue mi guía y amigo en toda mi investigación. También deseo agradecer a los profesores, tesisistas y practicantes del Laboratorio de Microbiología Molecular de la UNMSM, y a todo el personal del Laboratorio de tuberculosis del HNGAI por su apoyo y respaldo que me brindaron.

Un agradecimiento especial a mi amiga Jeannette Orbegozo, quien me saco de apuros técnicos llegado un momento en mi investigación y a mi amigo Marcos Sulca, con quien siempre discutía acerca de este trabajo.

A Todos Gracias Totales.

Contenido

Resumen	1
Abstract	3
1. Glosario y Abreviaturas	5
1.1. Glosario	6
1.2. Abreviaturas	7
2. Introducción	8
3. Antecedentes	13
3.1 Antecedentes de la tuberculosis	14
3.2 Tuberculosis en el Perú	20
3.3 Características Generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
3.4. Mecanismos de la resistencia hacia los antibióticos	29
3.4.1. Resistencia a Isoniacida (INH)	30
3.4.2. Resistencia a Rifampicina (RIF)	32
3.4.3. Resistencia a Etambutol (EMB)	32
3.4.4. Resistencia a Estreptomicina (SM)	34
3.4.5. Resistencia a Pirazinamida (PZA)	34
3.4.6. Resistencia a las Fluoroquinolonas	35
3.5. Epidemiología molecular de la tuberculosis: Contexto Histórico	36
4. Materiales y Métodos	41
4.1. Material Biológico	42
4.1.1. Cepa de Referencia	42
4.1.2. Cepas Clínicas que se estudiaron	42
4.2. Material de Laboratorio	43
4.2.1. Equipos	43
4.2.2. Reactivos	43
4.3. Métodos	44
4.3.1. Estudio de la susceptibilidad a las drogas antituberculosas	44
4.3.2. Recolección de los datos clínicos epidemiológicos	44
4.3.3. Genotipaje Basado en PCR	44
4.3.4. Visualización y análisis de los patrones genéticos	46
4.3.5. Análisis Estadístico	47
4.3.6. Estudio Bioinformático	47

5. Resultados	48
5.1. Estudio epidemiológico de la tuberculosis	49
5.1.1. Descripción de la población en estudio	49
5.1.2. Distribución geográfica de los agrupamientos	50
5.1.3. Susceptibilidad a antimicrobianos	52
5.2. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis	54
5.2.1. Cuantificación del ADN Genómico	54
5.2.2. Análisis del Genotipaje basado en PCR	55
5.2.3. Agrupamientos entre cepas resistentes y de los pacientes seropositivos para VIH	57
5.2.4. Agrupamientos más importantes	57
5.2.5. Análisis Discriminante de las agrupaciones	60
5.2.6. Estimación del riesgo de contagio de la población	61
5.2.7. Datos de las vías de contagio	65
5.3. Estudio bioinformático	68
5.3.1. Estudio Genómico comparativo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	70
6. Discusión	78
6.1. Epidemiología de la tuberculosis en Lima	79
6.1.1. Sobre la población en estudio	79
6.1.2. Sobre la transmisión de la tuberculosis en la población	80
6.1.3. Sobre la distribución geográfica de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	86
6.1.4. Sobre los niveles de resistencia a fármacos	87
6.2. Estudio genotípico molecular	90
6.2.1. Alto Número de polimorfismos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR	91
6.2.2. Relación Cepa Sensible Cepa MDR	101
6.2.3. Dos postulados bajo el principio de la parsimonia	102
6.3 Estudio Bioinformático y discusión sobre la técnica de genotipaje utilizado	105
6.4 Notas Finales	110
7. Conclusiones	118
8. Recomendaciones	121

9. Referencias Bibliográficas	123
Anexos	136
Anexo 1	137
Anexo 2	138
Anexo 3	143
Anexo 4	145

Resumen

Se caracterizaron los genotipos de cepas de *M. tuberculosis* resistente, multidrogorresistente (MDR), MDR asociada a resistencia a drogas de segunda línea (MDR plus) y sensible a las drogas que proceden de los distritos de Lima y Callao. Cuarenta y nueve pacientes con TB fueron incluidos en el estudio. Los genotipos de *M. tuberculosis* fueron establecidos por PCR usando el primer Mtb2 (5'-CGG-CGG-CAA-CGG-CGG-CA-3') en combinación con primers situados inversamente en los flancos repetitivos de la IS6110. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes para la obtención de información epidemiológica. La susceptibilidad a isoniacida, rifampicina, estreptomicina, etambutol, kanamicina, ácido p-amin-salicílico, tioacetazona y pirazinamida fueron estudiados.

El dendograma fue realizado por los agrupamientos de los perfiles genotípicos según el coeficiente de Dice. Los agrupamientos fueron usados como indicadores de la transmisión de la enfermedad y estos fueron combinados con los datos epidemiológicos para el estudio de riesgo de contagio. También se hizo un modelo *in silico* de la técnica usando programas bioinformáticos.

El 36,7% de los pacientes presentaron aislados sensibles a todas las drogas estudiadas. El 8,2%, 6,1%, 6,1%, 30,6% y 12,2% fueron resistentes a uno, dos, tres drogas, MDR y MDR plus, respectivamente. Los niveles de resistencia a isoniacida, estreptomicina y rifampicina, fueron los más relevantes, presentando niveles entre el 47 y 49%. El 16% de los pacientes fueron VIH+, tres de ellos presentaron cepas MDR, ninguno de estos pacientes presentó cepas MDR plus. El 42% de los pacientes MDR reportaron antecedentes de TB. La mayoría de las cepas, incluyendo las cepas MDR, procedieron del centro de Lima.

Según el análisis de genotipaje basado en PCR de 49 cepas de *M. tuberculosis*, se estableció la presencia de 42 tipos diferentes de perfiles genotípicos y 10 diferentes *clusters*, el número de bandas de cada perfil genotípico fue entre 7 a 1 banda (s). Algunos *clusters* incluían cepas drogo resistentes con cepas sensibles.

Los pacientes VIH+ y los menores de 30 años, poseían el mayor riesgo de infección por TB.

Las provincias de Lima y Callao presentan altos niveles de resistencia de *M. tuberculosis* a Rifampicina, Isoniacida y Estreptomicina, además estos lugares

concentran una gran población afectada por cepas MDR. Los aislados obtenidos mostraban una baja clonalidad, una alta variabilidad de genotipos y un bajo nivel de agrupación, este fenómeno afecta especialmente a los aislados MDR. Las agrupaciones existentes entre cepas resistentes y sensibles de igual genotipo son consecuencia de fracasos en el tratamiento de los pacientes. Se concluye que las colonias bacterianas de *M. tuberculosis* estudiadas, han estado circulando en las áreas de Lima y Callao durante más de 20 años, siendo factor de la aparición de las especies de *M. tuberculosis* XDR, hecho que se sustenta con la investigación realizada. La técnica de genotipaje basado en PCR tiene una alta repetitividad y una alta resolución para la observación de un gran número de polimorfismos dentro de una población de *M. tuberculosis*, por lo que es adecuada para realizar investigaciones epidemiológicas. Los estudios bioinformáticos comprueban su utilidad en este tipo de investigaciones.

Palabras Clave: *Mycobacterium tuberculosis*, genotipaje, drogo resistencia, MDR, MDR plus, VIH.

Abstract

We characterise the genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* both resistant, multidrug resistant (MDR), multidrug drug resistant plus (MDR plus) and susceptible to drugs strains come from Lima and Callao. Forty-nine patients with TB were included in the study. The genotypes of the *M. tuberculosis* isolates were established by PCR using the primer Mtb2 (5'-CGG-CGG-CAA-CGG-CGG-CA-3') in combination with primers sited at inverted repeats flanking IS6110. We revised the clinical history of the patients for epidemiological information. The susceptibility to isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, kanamycin, para-amin-salicylic acid, tioacetazon and pyrazinamide was studied.

The dendrogram were done for fingerprints join upon Dice coefficient. The clusters were used how infection sign and they were combined with the epidemiology data for a infection risk study. Too are made a virtual model to the technique using bioinformatics software.

The 36,7 % of the patients presents isolates susceptible to all the drugs tested. The 8,2%, 6,1%, 6,1%, 30,6% and 12,2% were resistant for one, two, three drugs, MDR and MDR plus, respectively. The resistance levels to isoniazid, streptomycin and rifampicin were the most relevant, ranged between 47% and 49%. The 16% of the patients were VIH+, three out of them presents MDR strains, while no MDR plus isolate was isolated from these patients. When considered the patients with MDR strains the 42,8% reported previous TB. The majority of the strains, included MDR strains, were concentrated in Lima centre.

Upon PCR-based genotyping analysis of 49 *M tuberculosis* strains, the presence of 42 different fingerprints and 10 different clusters were established, the number of bands for each fingerprint ranged from 7 to 1 band(s). Some clusters included drug resistant strains with sensitive strains.

The patients VIH+ and minor 30 ages, have statistically high risk of infection for TB.

The provinces of Lima and Callao present high levels of *M. tuberculosis* resistant to rifampicin, isoniazid and streptomycin, too these sites concentrated a high affected population with MDR strains. The recovered isolates presents a low level of clonality, showing a great variety of genotypes and a low level of clustering, these phenomena affects especially the MDR isolates. The clustering drug resistant strains and sensitive,

is product to failed treatments in the patients in that random appeared drug resistant stains that are infected to other person. We concluded that the colonies of *M. tuberculosis* studied, had been circulating in Lima and Callao areas during more 20 years, being factor to the appear of *M. tuberculosis* XDR species, support by the investigation .

The Genotyping based PCR technique have a high repetitive and a high resolution for the fingerprints analysis in a *M. tuberculosis* population, anyway this is useful for epidemiology investigations. The bioinformatic studies realize this point.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, Drug resistant, MDR, MDR plus, VIH.

1. Glosario y Abreviaturas

1. Glosario y Abreviaturas

1.1. Glosario

Cluster (agrupamiento o conglomerado): Dos o más cepas con idéntico patrón genético molecular (Díaz, 2003).

Coefficiente de Dice: Es una medida de similaridad relacionado con el índice de Jaccard.

Extradrogorresistencia: Es referido a los casos de tuberculosis que presentan resistencia a isoniacida, a rifampicina, a una fluoroquinolona y a 1 o más de las 3 siguientes drogas antituberculosas inyectables: capreomicina, kanamicina y amikacina. (MMWR, 2006; Rattan *et. al.*, 1998, Raviglione *et. al.*, 2007, WHO, 2007).

Fitness: Es una medida de la habilidad de un organismo a sobrevivir, a reproducirse, y en el caso de los microorganismos, a ser transmitido.

Fracaso terapéutico: Paciente que después de cinco meses de iniciado el tratamiento mantiene sus cultivos positivos para tuberculosis (WHO, 1997).

DR: La secuencia directamente repetitiva o DR (Direct repetitive sequence) posee unos pocos pares de bases ubicados en un único locus cromosomal y entremezcladas con secuencias espaciadoras. El número de DRs varía de 10 a 50 copias en el complejo de *M. tuberculosis*. La mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* contienen una o dos copias de IS6110 en la sección del genoma en donde se encuentra la secuencia DR (Díaz, 2003).

Multidrogorresistencia: Referido a los casos de tuberculosis que presentan resistencia asociada a las drogas Isoniacida y Rifampicina (WHO, 2007).

Multidrogorresistencia asociada a resistencia a drogas de segunda línea (MDR plus): Es referido a los casos de tuberculosis que presentan resistencia a isoniacida, a

rifampicina, y a una o mas drogas de 2 líneas, exceptuando las fluoroquinolonas (Comunicación personal con Ernesto Montoro, Instituto Pedro Kouri Cuba, 30 de abril del 2008 y Comunicación personal con Michael Iseman, National Jewish Health USA, 30 de abril del 2008).

Odds ratio: La palabra *Odds ratio* no posee traducción pero se puede interpretar como: razón de ventaja, razón de chances, o razón de productos cruzados.

PGRS: Secuencia polimorfica repetitiva rica en Guanina-Citosina o PGRS (Polymorphic GC-rich repetitive sequence), es una secuencia corta compuesta por muchas repeticiones imperfectas presentes en múltiples agrupaciones cromosomales. Las PGRS no están restringidas solamente al complejo de *M. tuberculosis* sino que están también incluidas en *M. kansasii*, *M. szulgae*, *M. malmoeense* (Díaz, 2003).

Resistencia Inicial: Es en los casos de los pacientes que no poseen antecedentes de tratamiento, los cuales son infectados con cepas de tuberculosis resistente (WHO, 1994-1997).

Resistencia Secundaria o Adquirida: Es en los casos de los pacientes que han tenido anteriormente un mes o más de tratamiento, en los cuales por una mala terapia, las cepas con las que están infectados adquieren la resistencia (WHO, 1994-1997).

1.2. Abreviaturas

TB: Tuberculosis

MDR: Multidrogorresistencia

MDR plus: Multidrogorresistencia asociada a resistencia a drogas de segunda línea

XDR: Extradrogorresistencia

PCR: Reacción de la cadena de la polimerasa

RFLP: Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción

VIH: Virus de la Inmuno deficiencia humana

VIH/TB: Asociación VIH con la enfermedad de la tuberculosis

2. Introducción

2. Introducción

Mycobacterium tuberculosis causante de la enfermedad de la Tuberculosis (TB) es uno de los agentes patógenos que produce la más alta morbi-mortalidad en el mundo, se estima que cerca de un tercio de la población mundial (2 mil millones de personas) están infectadas con este microorganismo, siendo la mayor parte de ellos poblaciones pobres de jóvenes adultos en edad productiva (Foschiani *et. al.*, 2002, Yang *et.al.*, 1995). También posee uno de los índices más altos de mortalidad en el mundo, dado que a pesar de ser una enfermedad curable es responsable de la muerte de 5000 personas todos los días (WHO 2006). Se estima que para el año 2020 cerca de 1000 millones de personas pueden contraer la infección, 200 millones desarrollar la enfermedad y 50 millones podrían morir a causa de esta (Bastian y Portaels, 2000; WHO, 2008). La aparición de la pandemia VIH/TB a agravado la situación, del cual *M. tuberculosis* es uno de los agentes que aumenta la mortalidad de las personas infectadas con VIH, reportándose que un cuarto de millón de personas muere cada año a causa de esta asociación (Edlin *et al.*, 1992; Coronado *et al.*, 1993; Small *et al.*, 1993; Ívens de Araújo *et al.*, 1998). En las Américas en el año 2006 fue reportada una incidencia para infección por *Mycobacterium tuberculosis* de 330 724 casos y 40 600 casos de muerte (WHO, 2008).

La aparición de las resistencias hacia las drogas antituberculosas siempre ha sido uno de los mayores problemas en la clínica y epidemiología de la tuberculosis (WHO, 2008). Estos se iniciaron desde mediados del siglo pasado, lo cual fue evolucionando con el tiempo llevando a la bacteria a resistir las acciones de fármacos bactericidas, como son la Isoniacida y Rifampicina (Bastian y Portaels, 2000), razón por la cual en un primer momento se llamaron Multidrogorresistencias (MDR). La Multidrogorresistencia (resistencia a isoniacida y rifampicina) según lo informado por la WHO se halla presente en los 109 países que reportan casos de tuberculosis en el mundo. En las Américas ha sido reportado que la tasa de incidencia de TB MDR es del 2,2% en casos nuevos, del cual el 13,2% son casos que presentan antecedentes de tratamiento. Dentro de los países que mayor tasa de casos de TB MDR está Perú, el cual reporta 5,3% de casos nuevos (WHO, 2008).

A mediados de 1990 en el sur de África fueron reportados casos nuevos de resistencias los cuales tenían la característica de además de presentar la MDR, tenían resistencia a fármacos de segunda línea en el tratamiento contra la tuberculosis. En el presente siglo, debido a la expansión de este nuevo tipo de resistencia hacia otros países en el mundo, obtuvo un interés epidemiológico y fue denominado Extradrogorresistencia (XDR). Este estudio fue publicado en Marzo del 2006 en el *Morbidity and Mortality Weekly Report* (MMWR) de los Estados Unidos de América, en el cual explica que la XDR es referido a los casos de tuberculosis que presentan resistencia a isoniacida, rifampicina, a una fluoroquinolona y a 1 o más de las 3 siguientes drogas antituberculosas inyectables: capreomicina, kanamicina y amikacina. (MMWR, 2006; Rattan *et. al.*, 1998, Raviglione *et. al.*, 2006, WHO, 2007). En el año 1997 se reportaron los primeros casos clínicos de XDR en el Perú, siendo uno de los primeros países de América Latina en reportar este tipo de resistencia (Perú, 2006).

La evolución de la tuberculosis en el Perú, ha tenido muchas complicaciones a lo largo de los años, siendo una de las razones por lo que en la actualidad somos uno de los países con mayor tasa de incidencia de TB (129 x 100, 000 habitantes) y mortalidad (20 x 100,000 habitantes), y a pesar de haber bajado un 50,4% en la tasa global de tuberculosis en relación con 1992 (año de máxima tasa con una incidencia de 248,6 x 100, 000 habitantes), los problemas relacionados a la MDR, XDR y asociaciones VIH/TB, siguen siendo parte de la realidad de nuestro sistema de salud (Perú, 2006).

La aplicación de la biología molecular en los estudios de esta bacteria ha cambiado el curso de todas las investigaciones, en el que destacan los cambios para los estudios epidemiológicos, en los que los marcadores moleculares cumplen un papel fundamental.

Los estudios moleculares sobre el genoma de *M. tuberculosis* recién se iniciaron durante la década de 1990. Los grandes enigmas entorno a esta bacteria en su mayoría fueron resueltos, y otros fueron descubiertos, debido a la complejidad de un genoma “simple” que no deja descubrirse por completo¹. Muchos dogmas han sido rotos, teorías basadas en la observación han sido reforzados con pruebas y otros han sido rechazados totalmente (Kremer *et. al.*, 1999; Palomino *et. al.*, 2007).

¹ Una ironía en relación a *Escherichia coli* que es la “vedette” entre las bacterias.

Sobre la base de las técnicas de Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) y de los Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), se hicieron estudios muy importantes que permitieron el desarrollo de métodos para la investigación de la epidemiología molecular de la TB. Así, Thierry *et. al.*, (1990) identificaron una secuencia de inserción en el genoma de *M. tuberculosis* que pertenecía a la familia IS3 y manifestaron la posibilidad de la creación de una técnica que permitiera usarse para la diferenciación de esta bacteria.

van Soolingen (1993) señala que la IS6110 puede tener importancia epidemiológica, y van Emben (1993) demuestra el alto polimorfismo genético de la IS6110 y la alta probabilidad de implementar una metodología para estudios epidemiológicos sobre la base de esta secuencia. Es así que van Embden *et. al.*, (2000) patentan la técnica estandarizada RFLP-IS6110, que actualmente es el “gold standard” para los estudios epidemiológicos en TB.

En el Perú las investigaciones epidemiológicas moleculares en *M. tuberculosis* con la técnica RFLP-IS6110 han sido solo 2 (Baldeviano *et. al.*, 2003; Capcha *et. al.*, 2005), de la que destaca la realizada por Capcha *et. al.*, (2005) en pacientes enfermos del distrito de Villa Maria del Triunfo y del Hospital Maria Auxiliadora, en la cual hallaron una gran dispersión de genotipos con una baja clonalidad. Luego de esta investigación no hay otras similares.

Kotlowski *et. al.*, (2004) desarrolló una técnica de genotipificación basada en PCR con primers de secuencias repetitivas ricas en GC y de secuencias repetitivas invertidas IS6110, hallando polimorfismos genéticos similares a los obtenidos con los estudios con RFLP-IS6110, brindando información de la cantidad de secuencias repetitivas, haciéndola una técnica de mayor poder discriminatorio.

En el Perú no se han realizado investigaciones epidemiológicas de TB con esta metodología.

Por lo antes señalado, es que se plantea caracterizar molecularmente, determinar y estudiar los patrones genéticos de resistencia a fármacos de cepas de *Mycobacterium*

tuberculosis resistente a alguna droga ó más, pudiendo ser MDR o MDR plus, en Lima y Callao mediante el uso de la técnica de Genotipaje Basado en PCR.

Por estas razones se plantearon los siguientes objetivos:

General

- Caracterizar molecularmente los aislados de *M. tuberculosis* de pacientes con TB resistente, TB MDR, TB MDR plus ó TB sensible que proceden de los distritos de Lima y Callao de la seguridad social, mediante la implementación de la técnica de Genotipaje basado en PCR.

Específicos

- Determinar la susceptibilidad a las drogas antituberculosas de las cepas incluidas en este estudio, para analizar los índices de resistencia a los antibióticos.
- Determinar mediante bioinformática los posibles patrones genotípicos obtenidos en la cepa patrón (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv), como modelo teórico para la verificación de la resolución de la técnica.
- Construir mediante modelos in silico, una emulación del proceso de Genotipificación basado en PCR con genomas de *M. tuberculosis* relacionados con cepas sensibles y los que presentan resistencias MDR y XDR, a fin de obtener un patrón comparativo para el presente estudio.
- Determinar la relación entre los patrones genéticos obtenidos mediante la aplicación de la técnica de Genotipaje basado en PCR, y la resistencia a fármacos antituberculosos en las cepas resistentes, MDR y MDR plus.
- Relacionar los datos epidemiológicos y moleculares que llevarían a establecer una conclusión referente a la eficacia del sistema de tratamiento para la tuberculosis en el Perú.

3. Antecedentes

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes de la tuberculosis

La tuberculosis inicio su historia, como epidemia humana, en el paleolítico, muy probablemente dentro de infecciones esporádicas que ocurrían dentro de grandes comunidades primitivas². Su comienzo se sitúa dentro del año de 8000 A. C cuando el hombre primitivo aprendía a cultivar y a domesticar animales, en este último escenario posiblemente se iniciaron las infecciones. Las primeras evidencias de esta enfermedad en humanos fueron hallados en restos óseos del neolítico, parte de esta evidencia fue estudiada por Paul Bartels en el esqueleto de un individuo adulto encontrado en Heidelberg en una tumba neolítica, el cual presentaba espondilitis tuberculosa, y también, según Moodie, por Paul Raymond el cual menciona en su obra “*Les maladies de nos ancestros a l’ age de la Pierre*” (1912), a dos ejemplares neolíticos con tuberculosis ósea vertebral y escoliosis (García, 1940).

Se piensa que la tuberculosis se inicio como mal endémico en los animales los cuales después infectaron a los humanos. *Mycobacterium bovis*, es la especie que mas probabilidad posee de haber participado en estos hechos y se cree que también fue la causante de las primeras infecciones con tuberculosis en humanos como lo muestran los restos hallados en Aymyrlyg, Sur de Siberia (Taylor *et. al.*, 1999). Por otra parte, *Mycobacterium tuberculosis* afecta a las especies primates, lo cual llega a suponer que los primates subhumanos también podían estar infectados, hecho que después se establecería en el género humano (Bloom, 1994).

Según la probabilidad de estos hechos existen 2 teorías que explicarían el origen de la especie *M. tuberculosis*, la primera en el cual señalan que la especie *M. tuberculosis* evoluciono de *M. Bovis* (Hass y Hass, 1996) y la segunda la cual sustenta que las especies antes nombradas devinieron de un ancestro común y evolucionaron independientemente (Bloom, 1994).

² Bajo la hipótesis de McGrath el cual menciona que para la existencia de una estabilidad huésped-patógeno en tuberculosis, deben existir al menos un grupo social de 180 a 400 personas los cuales crearan el inicio de la infección y el endemismo (McGrath, 1988).

Los registros óseos y de momias indican la presencia de infecciones con tuberculosis en culturas antiguas como Egipto, descrito por Grafton Elliot Smith y Marc Armand Buffer, ellos descubrieron la momia de un sacerdote de Amon de la XXI Dinastía faraónica (1100 años A.C) en el que le atribuyen infección por tuberculosis por la presencia de una cifosis moderada y la destrucción de la 3ra y 4ta últimas vértebras dorsales y la 1ra lumbar. También se especuló de la presencia de padecimiento por tuberculosis en el faraón Amenophis IV/ Akhenaton y su esposa Nefertiti³, incluso se nombra la existencia de una especie de sanatorio para tuberculosos que dataría del año 1000 A.C (García, 1940; Rosenberg, 1990). En el papiro Ebers (1550 A.C), el primer papiro médico conocido, se describen los síntomas de la consunción pulmonar asociada a adenopatías cervicales, lo cual podría ser la primera descripción clínica de un cuadro de tuberculosis (Rodríguez, 1997). En la cultura judía, según el Antiguo Testamento, se hace referencia sobre la tuberculosis como un castigo divino, enfermedad que habría afectado a los judíos durante su estancia en Egipto (Deuteronomio Cap. 28, ver. 22)

En la Grecia antigua, Herodoto de Halicarnaso (¿484-420? A. C.) fue uno de los primeros en hacer referencia de este mal. En el libro VII capítulo LXXXVIII de su “Ἱστορίαι” (Historiae) menciona la aparición de esta enfermedad en un general de la caballería del ejército persa de Jerjes durante su travesía hacia Grecia (Herodoto, VII, LXXXVIII. Los Nueve Libros de la Historia. Madrid. 2004).

Hipócrates de Cos (¿460-377? A. C.) En uno de sus “Tratados” detalla el cuadro clínico de la enfermedad que denomina “φθίσις” (Phthisis) en el que resalta la característica de las fiebres continuas, el vómito de sangre y la expectoración purulenta, aunque el concepto de tisis que él maneja lo atribuye también a otras patologías parecidas como tumoraciones pulmonares y abscesos no tuberculosos. Menciona una facultad hereditaria a la tuberculosis el cual lo sustenta bajo un estudio estadístico de la infección entre padres e hijos. Más fue Aristóteles (384-322 A. C.) quien la describe como “*contagious nature*”, en contraposición a las teorías anteriores (Palomino *et. al.*, 2007).

³ Cabe aclarar que esta es una especulación de hace 20 años aproximadamente, actualmente se observa con mas posibilidad que la aparente languidez del faraón Akhenaton fue por padecimiento del “Síndrome de Marfan” (Rosensweig, 1999)

Clarissimus Galen (131-207 D.C), el más eminente médico griego luego de Hipócrates, describiría con más detalle el proceso de la infección con tuberculosis, además de nombrarlo como “la enfermedad de la mal nutrición” (Palomino *et. al.*, 2007).

Durante el Imperio romano en el siglo V después de Cristo, Caelius Aurelianus médico romano y escritor, estudio los cuadros clínicos de la tuberculosis y creo un tratamiento para este mal que de alguna manera aduce a la “Helioterapia”⁴ (Enciclopædia Británica, 1995).

En la edad media existe la ausencia de investigaciones evocadas a esta enfermedad, más se pueden encontrar referencias de la presencia de esta, como en las pinturas de Alessandro di Mariano Filipepi “Sandro Botticelli” (1445-1510 D. C.) el que en las pinturas “La primavera” (1485 D. C.) y el “Nacimiento de Venus” (1477-1478 D. C.), reproduce con fidelidad las fases hética⁵ y febril de la tuberculosis de su amante, la hermosa Simonetta Cattaneo de Vespucci (1453-1476 D. C.) (McCray *et. al.*, 1997).

Uno de los retratos pictográficos más raros en aquella época, es el ejecutado para Carlos IV, durante la ceremonia del “toque real”, en el que tocaba las escrófulas (úlceras) de los enfermos de tisis ganglionar pronunciando las palabras mágicas “*Roy te touche, et Dieu te guérit*” (El rey te toca, Dios te cura), bajo el pensamiento de divinidad del rey (Neyra, 1997).

Siglos después continua expandiéndose esta enfermedad hasta que en el siglo XII Europa sufre los estragos de la primera gran epidemia con tuberculosis el cual llama “La Gran Peste Blanca”, llamado de esta manera por la palidez que produce esta enfermedad en contraposición con “La Peste Negra” (peste bubónica) que se dio en el mismo tiempo. Gottschlich describe a ambas epidemias de la forma siguiente: “El estival de distribución irregular, forma bubónica, propagación por ratas y mortalidad poco elevada y el invernal, de origen humano, forma neumónica y elevada mortalidad” (Enciclopædia Universal ilustrada, 1921). “La Peste Blanca” continuó durante 200 años. Fue en el año 1650 en el que se indica que la tuberculosis es la causante de la alta mortalidad. En

⁴ Método curativo que consiste en exponer a la acción de los rayos solares todo el cuerpo del enfermo o parte de él (RAE, 2007).

⁵ Hético, ca. Adj. TÍSICO. Dícese de la fiebre que se caracteriza por grandes oscilaciones diarias (Diccionario de Ciencias Médicas Dorland, 1975).

Holanda Franciscus Sylvius de la Bøe (1614-1672) fue el primero en manifestar la presencia de tubérculos como característico en los cambios fisiológicos pulmonares de los pacientes que padecían consunción. En Inglaterra Richard Morton (1637-1698), confirmó la presencia de los tubérculos en todos los pacientes que presentaban la enfermedad de la tuberculosis. La nominación actual de “tuberculosis” en la terminología médica probablemente tenga una conexión con la teoría de Gaspard Laurent Bayle (1774-1816), sobre la presencia de los tubérculos durante la enfermedad, pero más precisamente con el profesor alemán Johann Lukas Schönlein (1793-1864), el cual nomina “tuberculosis” a la enfermedad producida por tubérculos. Esta idea fue respaldada por Giovanne Battista Morgagni en Padua (1682-1771) y por Rudolf Virchow en Berlin (1821-1902) (Herzog, 1998). De forma contraria René Théophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826) de Francia, creador de la auscultación mediata por medio del estetoscopio, rechaza esta teoría, falleciendo de tuberculosis en su intento de probar que los tubérculos no creaban la enfermedad al inocularse extractos líquidos de los mismos (Neyra, 1997).

Desde 1546 con el libro de Girolamo Fracastoro (1478-1553) “*De Morbus Contagiosus*”, se mencionaba de la presencia de pequeñas partículas contagiosas que sobrevivían en las ropas de los enfermos por 2 años. Benjamin Marten (1704-1722) en su libro “*A New Theory of Consumptions*” de 1720, relata de la presencia de diminutas criaturas vivientes que al ingresar en el individuo creaban la consunción y la tisis. Ya en 1865, Jean-Antoine Villemin (1827-1892) explico acerca de los contagios entre los animales domésticos y el ser humano, y casi al mismo tiempo William Budd (1811-1880) luego de una investigación epidemiológica, llegó a la conclusión de la existencia de gérmenes específicos para el mal de la tuberculosis (Palomino *et. al.*, 2007).

En la noche del 24 de marzo de 1882, ante una escéptica audiencia, la más grande eminencia científica de la época Robert Koch (1843-1910) hace la presentación de su *Die Aetiologie der Tuberculose* ante la Sociedad Médica. Usando un medio sólido de su invención a base de papa y agar, obtuvo cultivos puros de su bacteria⁶. Su colega Julius Richard Petri (1852-1921) había creado unas placas especiales para realizar los cultivos

⁶ Louis Pasteur a la época había creado medios líquidos para el aislamiento de microorganismos, más su metodología no extraía una colonia bacteriana pura, siempre se debía utilizar el microscopio para poder identificar los contaminantes (Brock, 1999).

(Placas Petri), que ahora son de uso común en los estudios bacterianos. Koch también desarrollo una tinción especial para la visualización de las bacterias en el microscopio, basado en la técnica de Paul Ehrlich (1854-1915), en el que se usa el azul de metileno, en el cual “las bacterias se ven en un hermoso azul”⁷ (Bloom, 1994; Brook, 1999; Palomino *et. al.*, 2007).

Ante la audiencia presento todos los resultados de su investigación. El demostró que la bacteria observada en un primer momento al microscopio, era la misma que crecía en los medios de cultivo y la que infectaba a los conejillos de indias en el que se experimentaba, y sea cualquiera el órgano infectado la bacteria siempre era la misma, explicando que este microorganismo era el causante de la enfermedad, en referencia a ello concluye “... las bacterias observadas en las lesiones tuberculosas no están siempre relacionadas a la tuberculosis, aunque rara vez lo hacen. Este bacilo es el verdadero agente de la tuberculosis” (Kaufmann, 2005).

Koch continuo su trabajo en el ámbito de definir las infecciones por contagio, tarea que también se le atribuye en un comienzo a su mentor, Jacob Henle (1809-1885), aunque no fue formulada hasta 1884 por Robert Koch y Friedrich Loeffler (1852-1915). Aunque finalmente en 1890 Koch es el quien estandariza el método y la publicación lo realiza solo a su nombre (Palomino *et. al.*, 2007).

Koch marco una época en el que las investigaciones en torno a la tuberculosis tenían un rumbo fijo, dado que se tenía la base, tan solo faltaba edificar la obra.

Pero a pesar del conocimiento o la ignorancia del causante de la enfermedad de la tuberculosis, sus incontables victimas se relatan desde el inicio de esta historia, en los cuales en algún momento no distinguía raza o clase social. No se puede nombrar a todas sus victimas y se tratara de recordarlos con personajes que marcaron época en algún tiempo: Jean-Baptiste Poquelin (1622-1673) “Molière”, quien padeciendo de tuberculosis murió en el escenario interpretando su obra “*Le malade imaginaire*” (“El enfermo imaginario”) tras sufrir de una hemoptisis masiva. John Keats (1795-1821), uno de los principales poetas del movimiento romántico ingles, observa la muerte de su

⁷ Palabras de Koch en su presentación ante la Sociedad Médica en Berlín 1882 (Brook, 1999; Palomino *et. al.*, 2007)

hermano por la consunción, mal que también tomaría su vida. Fryderyk Chopin (1810-1849), virtuosísimo pianista y compositor polaco quien padeció de este mal y falleció por ella. Se puede mencionar la novela de Alexandre Dumas (hijo) (1824-1895) el cual inmortalizó la agonía de su amante Alphonsine Plesis por el mal de la tuberculosis en su obra "*La Dame aux camélias*" ("La Dama de las camelias"). Antón Chejov (1860-1904), dramaturgo y cuentista ruso, considerado uno de los más importantes escritores de las letras modernas, murió a causa de esta enfermedad. Franz Kafka (1823-1924), uno de los mayores narradores del siglo XX, también padeció y murió por este mal. George Orwell (1903-1950), pseudónimo de Eric Arthur Blair, escritor socialista y periodista británico conocido por sus novelas críticas ante los regímenes totalitarios "*Animal Farm*" ("Rebelión en la granja") y "*Nineteen Eighty-Four*" ("1984"), falleció a la edad de 46 años víctima de la tuberculosis (Neyra, 1997; Palomino *et. al.*, 2007).

La tuberculosis se convirtió durante el siglo XX en una de las enfermedades transmisibles de mayor importancia razón por el cual la WHO desde mediados de 1990 implementó a nivel mundial una nueva estrategia para el tratamiento de la tuberculosis, la cual denomina DOTS, en una acción para detener la alta morbilidad y mortalidad de la tuberculosis en el mundo (WHO, 1997; 2008; Perú, 2006). La recomendación de la WHO expresa la implementación del tratamiento acortado directamente observado⁸ (DOTS), monitoreado y supervisado por los programas de control para la tuberculosis (PCT), y bajo el sustento del financiamiento y apoyo de las entidades públicas y de los gobiernos (WHO, 2008; Perú, 2006).

Fue en 1902 en Berlín durante la Conferencia Internacional sobre la Tuberculosis en el que se propone a la Cruz de Lorena (Cruz de dos brazos que se muestra al inicio del texto) como símbolo de la lucha contra la tuberculosis, cruz creada por Godfrey de Bouillon (1060-1100), duque de Lorraine como símbolo del coraje y éxito de las cruzadas (Palomino *et. al.*, 2007).

⁸ En un comienzo se llamó tratamiento directamente observado "Directly Observed Treatment", DOT), pero a partir de 1998 se le denominó tratamiento acortado directamente observado ("Directly Observed Treatment, Short-course", DOTS) (WHO, 2008).

3.2 Tuberculosis en el Perú

Se presenta un compilado de las más importantes investigaciones realizadas en el Perú en torno a la tuberculosis. Muchas de ellas olvidadas y otras no reconocidas en la actualidad. Y al final se citaran las fases que ha tenido, durante el tiempo, el sistema moderno de tratamiento contra la tuberculosis en el Perú.

La tuberculosis en el Perú y en Sudamérica se estableció antes de la llegada de los conquistadores, y antes de la creación de los grandes imperios. Evidencia de ello son los estudios en los restos momificados de la cultura Chachapoyas que datan aproximadamente del año 1000 A. C., publicado por la universidad de Quinnipiac (Connecticut) y el museo de Arqueología Amazónica del Perú en el año 2001, sus hallazgos muestran la presencia de los estragos de una infección en huesos de la columna y en pulmones, mediante estudios por rayos X (BBC, 2001). El trabajo más comentado es el encontrado en una momia del sexo femenino, datado con 1000 años de antigüedad, de la localidad de Chiribaya Alta (Ilo), en el que se examinó la presencia de TB y además se realizó un examen molecular de las muestras encontrando en ellas la presencia de la secuencia IS6110, la cual es propia de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Salo *et. al.*, 1994).

Una investigación perdida en el tiempo y guardado en el Fondo Reservado de la Biblioteca Central de la UNMSM, fue realizado en el año 1940 por el Doctor Elías García Frías, quién publicó el artículo “La tuberculosis en los Antiguos Peruanos”. García comenzó su investigación en momias cuya datación podía ser pre-colombino o colonial, en los que practicó directamente una autopsia para la observación *in situ* de patologías relacionadas a una infección con tuberculosis; luego con la ayuda del Dr. Pagel del instituto de la TB de Papwoxt, Cambridge realizó estudios histológicos de los tejidos afectados y de coloración de extractos de los órganos afectados. Como resultados, halló patologías relacionadas con la tuberculosis, presencia de nódulos mesenteriales caseo-calcificados osificados, alteraciones óseas atribuibles a la tuberculosis y también observó la presencia de Bacilos Alcohol Ácido Resistentes

(BAR) en algunas de las momias estudiadas. Realizó un intento de cultivarlos para la identificación de su especie pero no pudo lograrlo.⁹

Con la experiencia citada, el Doctor García solicitó el estudio de momias precolombinas al Museo de Arqueología (Ahora llamado Rafael Larco Herrera). Anterior a ello él tenía el antecedente de la existencia de huacos con figuras de jorobados probablemente consecuencia de una infección tuberculosa, o que poseían cabezas afectadas con tuberculosis cutánea (*Lupus vulgaris*). Con la ayuda del Dr. Valcarcel y sus colaboradores, realizó las gestiones para llevar dos momias, la de un “Anciano orejón” y un “jorobado” a Inglaterra para un estudio más exhaustivo. Realizó autopsias y estudios de rayos X para ambas momias. En la momia del “Anciano orejón” halló patologías tuberculosas en los pulmones (presentaban pigmentación antracótica¹⁰ y adherencias y bridas¹¹ en ambos vértices), de igual manera en el Jorobado (espondilitis tuberculosa), los estudios con rayos X confirmaron la presencia de nódulos calcificados en ambas muestras. Al final él hace el hincapié de otras investigaciones, como las realizadas en momias egipcias y francesas, en la cual los investigadores solo mostrando evidencias de malformaciones óseas han aceptado la presencia de tuberculosis en los restos estudiados, y al contrario, él en su investigación no solo realizó esa labor sino que además encontró la bacteria causante de ese mal, termina diciendo que espera la continuación de sus investigaciones para las siguientes generaciones, recomendación que desgraciadamente quedó en el olvido hasta la actualidad (García, 1998).

No existen referencias directas en la época incaica de cómo nuestros antepasados afrontaban este mal, aunque existen crónicas que señalan de una prevención hacia la “agresión climática”, generadora de enfermedades, un pensamiento parecido al de Hipócrates (Neyra, 1997).

Para la época colonial existía la leyenda del Inca Túpac Yupanqui, el cual padeció de tuberculosis y se curó durante su estancia en Jauja. Siendo esta ciudad la primera capital del Perú sirvió como instancia para la curación de los españoles enfermos de

⁹ En esa época aún no existían las metodologías moleculares.

¹⁰ Coloración oscura parecida a la neumocosis producida por el polvo del carbón (RAE, 1992)

¹¹ Filamentos membranosos que se forman en los labios de las heridas o en los abscesos.

tuberculosis y otros males, tal y como ellos acostumbraban ir a los pirineos o los alpes en Europa para recuperarse (García, 1998).

Hipólito Unanue (1755-1833) médico, científico y prócer de la independencia, dentro de una madurez intelectual, afirmó que el clima húmedo de Lima tenía acción favorable en la acción a la tuberculosis, como contraparte sustentatoria de la anterior afirmación, Antonio de Ulloa (1716-1795) científico, militar y escritor español dijo que “el clima de la sierra no era temperamento de los héticos, y al contrario era bajo propenso de ellos” (Neyra, 1997).

Existen muchos trabajos sobre los Auspicios y las casas de Sanidad en el Perú para la tuberculosis, más existe un solo autor que resalta entre todos el cual es José Maria Zapater, el cual comienza su carrera científica con su tesis para Bachiller de Medicina publicado en 1866 y titulado “Influencia perniciosa del clima de Lima en la tisis pulmonar tuberculosa”. Según Neyra en ella relata lo que posteriormente seria su teoría con respecto a la tuberculosis, en el que señala que el alto contenido de oxígeno de Lima favorece en el desarrollo de la tisis, caso contrario con los climas de la Sierra, algo relativamente acertado teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* es una bacteria aerobia. Realiza también una clasificación de las fases de la tuberculosis el cual es muy parecido al que se tomaría como patrón durante la primera mitad del siglo XX (Zapater, 1871; Neyra, 1997).

En el lapso de esos años el futuro presidente del Perú Manuel Pardo (1834-1878) sufriría de la tuberculosis, curándose por el clima de Jauja como el mismo lo afirmara. Fue en 1871 en el que Zapater publica, la que se denomina su gran obra: “Sobre la Influencia del Clima del Valle de Jauja en la Enfermedad de la Tisis Pulmonar Tuberculosa”, el cual fue dedicado al Dr. Manuel Pardo por su lucha contra la tuberculosis tal y como menciona en su prólogo. Más allá de lo que dicen algunos autores sobre esta obra, lo más impresionante no es su defensa ante el clima de la sierra para los enfermos tísicos, sino la implementación de una metodología de investigación moderna para aquella época, en el que demuestra lo que debe de ser el conocimiento científico, generando un principio hipótesis, del cual luego busca pruebas que lo sustenten y utiliza todos sus conocimientos físicos, químicos y biológicos que el posee, generando finalmente discusiones y conclusiones que aún no se habían afirmado en

aquel entonces, como la explicación física de la lipotimia y también su relación con lo que puede suceder con los enfermos tísicos. Adelantándose a su época realiza un estudio epidemiológico de la tuberculosis, recolectando datos anuales de los enfermos tísicos, clasificándolos por sexo, edad, y lugar de residencia (Costa o Sierra), reparando mucho en la residencia como un factor de incidencia de la mortalidad, y a pesar de no contar con estudios estadísticos que apoyen su tesis, tiene conclusiones verosímiles y con honestidad, dado que manifiesta que los climas de las alturas no son determinantes para eliminar la tuberculosis, pero que si ayudarían a bajar su mortalidad (Zapater, 1871; Neyra, 1997).

Ya a mediados del siglo XX la tuberculosis era un mal social, con el cual ya se comenzaba a luchar, fue en 1895 que luego de la formación de una comisión mixta de la junta de gobierno, se aceptó la creación del primer hospital para la terapia antituberculosa en el Perú y con los consejos de los doctores Francisco Almenara Butler y Remigio Errequeta esta se crea en Jauja. En 1913 Raul Rebagliati, propone la idea de una Liga Antituberculosa peruana. Más la continua inestabilidad política del país que estaba inmerso entre los golpes de estado, dictaduras falaces y dentro de una era de caudillos que desestabilizaban aún más nuestra alicaída situación, hicieron que los gobiernos olvidaran todo lo referente a la salud y claro esta, también con la tuberculosis (Neyra, 1997).

Ahora bien, siendo parte de la historia y como anécdota, es bien conocida las prácticas “bohemias” de los estudiantes de medicina desde las épocas de la colonia, los cuales frecuentaban lugares *non sanctos*, así pues fue en uno de esos lugares, el más conocido desde el siglo pasado, que el 7 de Noviembre de 1936 se creo la Sociedad peruana de Tisiología en respuesta a la necesidad de una voz en la lucha contra la tuberculosis en el Perú (Neyra, 1997).

Dentro de la labor que realizó esta sociedad caben resaltar la creación de las Jornadas Nacionales de Tisiología en el año 1940, la Revista de Tuberculosis en el año 1941 y en 1952 la realización el II Congreso Nacional de Tuberculosis después de 12 años. Contribuyeron económicamente dentro de las áreas de salud y de investigación, realizando dignas presentaciones en eventos internacionales desde el IV Congreso Panamericano de tuberculosis en Chile (1934), en el que estuvo Ovidio Rosell como

único representante del Perú, recogiendo buenas críticas de la prensa Chilena, hasta el último en Caracas (1953), también estuvieron en congresos internacionales de Madrid, Copenhague y Río, con dignas representaciones (Neyra, 1997).

Es interesante y cabe resaltar la presencia de la Antigua Escuela San Fernandina en las palabras de los miembros de la Sociedad, esta alusión se puede observar en la primera edición de la Revista de Tuberculosis (1941) en cuyo editorial se puede percibir la presencia de un énfasis social y ético dentro de la labor que ellos se imponen realizar. Aunque también se perciben ideas intrigantes dentro de sus editoriales y publicaciones, como por ejemplo cuando señalan que las prácticas de profilaxis¹² no deberían de ser tomados aún dado que evocaban conceptos errados, una práctica que otros países se realizaban con cierto éxito en años posteriores. Este tipo de pensamiento también lo señalan en el V Congreso Panamericano de tuberculosis en Argentina (1941), en el que de forma sutil también señalan como una medida apresurada las prácticas realizadas con las vacunaciones con BCG, el cual fue comenzado a utilizar en Chile en la década de 1950 y fue una de las herramientas principales para la lucha contra la tuberculosis en aquel país (Chile, 2005). Fue la única representación que estuvo en contra. Quizás este tipo de criterios sea debido al sentido de ética que tenía San Fernando en aquel entonces, dado que en aquel momento las prácticas criticadas, aún se encontraban en estadios de experimentación.

Quizás la edición mas extraordinaria es la de Enero-Junio de 1952 que de alguna manera recuerda a “La Consagración de la Primavera” de Stravinsky, dado que estereotipa un concepto futuro, en el que comienza con estudios de drogoresistencia y culmina con los estadísticos de mortalidad de la tuberculosis en el Perú, pero también por el brillo propio de sus trabajos dado que muchos de sus conceptos de drogoresistencia no se ven si no luego de 20 años, ejemplos de ello son los trabajos de Galvez Brandon, 1941, en el que estandariza un método de examen de susceptibilidad a drogas muy parecida a la de Canetti en 1963, también dentro del trabajo hace alusión a una secuencia de la resistencia de una colonia a isoniacida que luego es resistente a estreptomycin (Pillay y Sturn, 2007), menciona también la posibilidad de sensibilidades diferentes en los diferentes tejidos afectados, tema que también discute en la misma

¹² La profilaxis es la administración de drogas antibacterianas para la prevención de una enfermedad.

edición Vargas Machuca y Rey de Castro, 1952, dado que el efecto de los antibióticos sobre un tejido que presenta una lesión severa, será menor que el que presenta una lesión leve dentro de un periodo corto de tiempo (Bloom, 1998).

Luego de la última edición de la revista de la tuberculosis a finales de 1950, poco se ha visto el interés científico en esta enfermedad, mostrando algunos pocos trabajos realmente buenos y muchos otros cuyo énfasis social y científico, que exige esta enfermedad, se pierde en el vacío.

En la década del cuarenta se perdieron por la tuberculosis muchas glorias del deporte como Alejandro Villanueva, el popular “Manguera”, baluarte del club Alianza Lima y creador del famoso caracol, fallecido en el hospital Dos de Mayo en 1944, también hay que citar a José “Chicha” Morales y a Bom Bom Coronado, fallecidos también en el Dos de Mayo (Neyra, 1997).

En el Perú la aplicación de los sistemas de tratamiento moderno se inicia en la red de Seguridad Social en 1978, y en el Ministerio de Salud como proyecto piloto en 1983. Ambos sostenidos por un programa débil de control de TB y un tratamiento generalmente autoadministrado, de los cuales solo el 35% de la población de enfermos con tuberculosis accedió a este sistema y de aquellos ni siquiera el 50% fueron curados debido a las altas tasas de abandono y fracaso de tratamiento. Consecuencia de ello fue la acumulación de casos TB resistente a antibióticos (Perú, 2006).

Debido a los bajos recursos en la década de 1980 el abastecimiento de medicamentos era continuamente interrumpido, lo que empeoró la situación de la drogoresistencia. Y aún teniendo el esquema de tratamiento por autoadministración y manteniendo los problemas anteriores, en 1987, se incluye en el tratamiento Etambutol y Kanamicina, este último antibiótico de segunda línea relacionado con la XDR (Perú, 2006).

Durante la década de 1980 se seguía aplicando el esquema UNO (tratamiento basado en la administración de Rifampicina, Isoniacida, Pirazinamida y Etambutol con seis meses de duración) a pacientes con antecedentes de tratamiento, de los cuales actualmente se sabe que eran resistentes a antibióticos. Por lo que de esta manera se dio comienzo a la endemia de TB MDR en el Perú. Las noticias sobre la resistencia clínica a antibióticos y

los cambios de sistema terapéutico para los casos antes tratados llegaron recién a fines de 1980 (Perú, 2006).

Recién en 1990 llega la estrategia DOTS al Perú, cuando en Chile ya se encontraba por más de 10 años, esta consiste en la administración del tratamiento directamente observado, en la cual la toma de antibióticos se realiza en forma simultanea, diaria y a la misma hora (Chile, 2005; WHO, 2006;2008).

En 1996 se aplicó el Esquema DOS en el sistema terapéutico contra la tuberculosis (incluía los antibióticos Rifampicina, Isoniacida, Pirazinamida, Etambutol, y Estreptomicina, tratamiento con 8 meses de duración), el cual llegó con mucha polémica al Perú dado que ya se sabía que los casos MDR se debían al fracaso al esquema UNO, a pesar de ello se aplicó este sistema a los casos MDR pero solamente usando Estreptomicina para su tratamiento, lo que empeoró la situación creando más tipos de resistencias, y aumentando la población de pacientes TB MDR.

En 1997 se cambia la indicación del esquema DOS y el tratamiento solo se da en casos de recaídas y abandonos recuperados, años después se notificarían los primeros casos de XDR¹³. En los siguientes años se aplicó el esquema DOS reforzado¹⁴, aumentando los índices de fracasos terapéuticos y mortalidad en cada año después de su aplicación, reportándose hasta un 70% de fracasos en las principales regiones de Salud. Este esquema recién fue retirado en el año 2001.

La Base de datos registra solo 700 sobrevivientes del hecho anteriormente mencionado, de los cuales se estima que existían cerca de 2500 pacientes que habían fracasado al esquema DOS reforzado.

Recién en el año 2005 se uniformizan los criterios y técnicas empleados en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis MDR en el país, en el que se aconseja aplicar los retratamientos individualizados para los casos MDR.

¹³ Para la época aún no se tenía la definición de Extradrogresistencia, dado que este aparece hasta el año 2006.

¹⁴ No existen referencias al respecto, documentos de la época han desaparecido, al parecer según algunas historias clínicas se trataría de un esquema DOS con aumento de la dosificación.

Para la fecha con más de 35, 000 enfermos de TB, y con la presencia de TB MDR y XDR, recién en el año 2007 fue pronunciada la alerta roja sobre la situación de la tuberculosis en el Perú.

3.3 Características Generales de *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias pertenecen al género *Mycobacterium*, único de la familia Mycobacteriaceae dentro del orden de los Actinomycetales, e incluido dentro del grupo de los bacilos aerobios grampositivos (Rastogi *et. al.*, 2001).

Son consideradas bacilos alcohol ácido resistentes al presentar resistencia a decoloración con alcohol ácido al 3% durante la tinción Ziehl-Neelsen. Esta propiedad se debe a la presencia en la superficie celular de componentes lipídicos llamados ácidos micólicos, únicos en el género *Mycobacterium*. Morfológicamente son bacilos o cocobacilos ligeramente rectos, en pocas ocasiones ramificados que miden entre 0,4 a 0,3 μm , no esporulan y no tienen flagelos o cápsulas. Tampoco tienen la capacidad de utilizar los mecanismos de conjugación genética (Madigan *et. al.*, 1999; Lemus, 2003).

La envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* esta conformada por 3 grandes componentes: Un complejo de unión covalente de ácido micólico, arabinogalactano y peptidoglicano (MAPc); y un estrato rico en polisacáridos (Figura 1). Los peptidoglicanos (PG) en *micobacterias* poseen características propias en relación a otras bacterias. Por ejemplo: Las cadenas de glicanos están compuestas alternadamente por uniones de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-glicolilmurámico (MurNGlyc), mientras que otras bacterias poseen los enlaces N-acetilmuramico. El arabinogalactano (AG) es un polímero único de arabinofuranosa (ara f) y galactanofuranosa (gal f). Los ácidos micólicos están esterificados, en grupos de cuatro, a dos tercios de los arabinofuranosidos terminales (Cole *et. al*, 2005).

Existen dos modelos que explican la conformación del MAPc, el primero que es el clásico en el que predice que los PG y los galactanos están en forma paralela a la membrana plasmática. Sin embargo, recientes estudios de mecanismos moleculares sugieren que es posible indicar que las cadenas de PG y AG se encuentran enrollados y en plano perpendicular a la membrana plasmática (Hong y Hopfinger, 2004).

Los canales en la pared celular de las *micobacterias* son de naturaleza proteica, los cuales constituyen una ruta de entrada de los antibióticos hidrofílicos como la Isoniacida, mientras que grandes moléculas hidrofóbicas como la Rifampicina o los macrólidos ingresan a través de la capa lipídica.

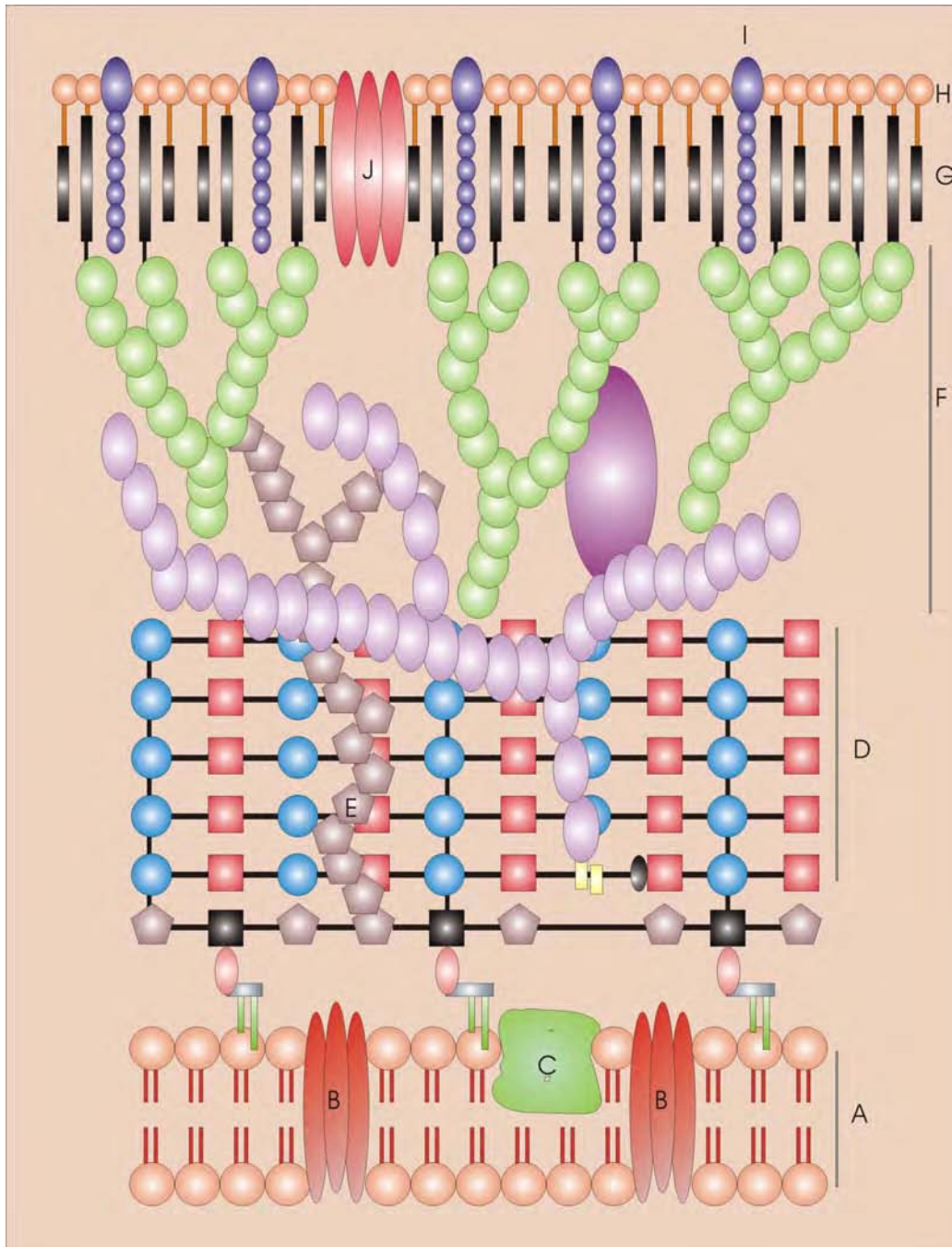


Figura 1. Esquema de la pared celular de las micobacterias A. Membrana Citoplasmática, B. Proteína transmembranal, C. Proteína no transmembranal, D. Peptidoglicano, E. Lipoarabinomanano, F. Arabinogalactano, G. Ácidos micólicos, H. Glicolípidos, I. Lípidos Libres, J. Porina (Hong and Hopfinger, 2004; Benz, 2008).

3.4. Mecanismos de la resistencia hacia los antibióticos

El tipo de tratamiento actualmente utilizado según la estructuración de la WHO posee el siguiente esquema. Dos meses continuos de un régimen compuesto por los antibióticos: Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), y Etambutol (EMB) ó Estreptomicina (SM). Terminado los dos meses se continúa el tratamiento con 4 meses más con la administración de los antibióticos INH y RIF, para eliminar alguna posible persistencia del bacilo (WHO, 2002). INH y RIF son las drogas antituberculosas más potentes, las cuales en los dos primeros meses de tratamiento eliminan el 99% de las bacterias (Mitchinson *et. al.*, 1985; Iseman *et. al.*, 1989).

Más este uso marcado de los antibióticos INH y RIF, genera de igual manera una marcada selección de bacterias que serán resistentes a estas drogas, por lo que el paciente finalmente solo tendrá que ser tratado con antibióticos mucho menos eficaces y con mayores efectos tóxicos, además de aumentar los rangos de mortalidad en especial de los pacientes con asociación a VIH (Rattan, 1998).

Anteriormente se mencionaron las terminologías de MDR y XDR, relacionadas a las resistencias a INH y RIF. Los estudios moleculares señalan que la resistencia a antibioticos se pueden deber a los siguientes factores: i) la alteración del blanco de la droga, ii) la inactivación de la droga y iii) la sobreproducción del blanco de la droga.

Desde el año 1970 se menciona de la aparición esporádica de las resistencias en forma general dentro de estudio de crecimiento bacteriano, cuando la bacteria alcanza la concentración de 10^3 UFC pueden aparecer espontáneamente bacilos resistentes a tiacetazona, etionamida, capreomicina, cicloserina y viomicina, a una concentración de 10^6 UFC aparecerán resistentes a INH, SM, EMB, kanamicina y acido p-amino salicílico y en la concentración de 10^8 UFC aparecerán resistentes a RIF. Más la presión selectiva que originan los antibióticos en la realidad de un paciente con tratamiento, modificarían estos números, siendo lo más probable la aparición de resistentes a antibióticos a menores concentraciones bacterianas (David, 1970; Bloom, 1994; Rattan *et. al.*, 1998, Bastian y Portaels, 2000).

3.4.1. Resistencia a Isoniacida (INH)

La Isoniacida (hidrazida del ácido isonicotínico), es una droga sintética introducida en 1952, posee un efecto bactericida sobre *M. tuberculosis*. Los mecanismos de acción de la INH son bien conocidos, más los de resistencia aún no han sido determinados. INH inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular haciendo a la bacteria susceptible a los radicales oxígeno y otros relacionados. Para su activación necesita la presencia de la enzima catalasa-peroxidasa (KatG) y un electrón (peróxido de hidrógeno) (Shoeb *et. al.*, 1985). Siendo KatG el blanco de INH, una mutación dentro de su secuencia, generará invariablemente la resistencia a INH (Maggliozzo *et. al.*, 1996; Rattan *et. al.*, 1998). Sin embargo, la pérdida de la actividad de Kat G es paradójica siendo esta la única proteína peróxido inducible que posee *M. tuberculosis*. Más se ha hallado que ante la presencia de una mutación en KatG se produce la sobre expresión de la proteína AhpC, cuya función es la detoxificación de los peróxidos orgánicos cumpliendo actividades alquil-hidropoxidasa y tioredoxin-peroxidasa dependiente. Esta sobre-expresión es ocasionada por las mutaciones de los promotores de este gen ubicados en la región 5' la cual sería regulada por la proteína OxyR (Chae *et. al.*, 1994; Sreevatsan *et. al.*, 1997).

OxyR es una proteína reguladora que cumple funciones de sensor del estrés oxidativo de la bacteria y activador de genes de transcripción. OxyR controla las expresiones de los genes relacionadas a enzimas detoxificadoras como las catalasas-peroxidasas o las alkyl hidropoxidasas, codificadas por *katG* y *ahpC* respectivamente (Figura 2) (Maggliozzo *et. al.*, 1996; Sreevatsan *et. al.*, 1997; Rattan *et. al.*, 1998).

Aunque se ha hallado relaciones directas entre ciertas mutaciones en *katG* con las mutaciones que inducen la sobre-expresión de *ahpC*, no son en todos los casos como por ejemplo las mutaciones en el codon katG315 en el cual no existe observación de sobre-expresión de *ahpC* (Heym *et. al.*, 1994; Rouse *et. al.* 1995).

Cabe señalar que en *katG* ocurren mutaciones puntuales las cuales son inserciones o deleciones de 1 a 3 pb que compromete la inactivación de todo el producto del gen ó solo la actividad peroxidasa de la proteína producto del gen (Figura 2). Algunos

estudios han demostrado que existe aproximadamente un 67% de correlación entre una mutación en *katG* y la resistencia a INH (Sreevatsan *et. al.*, 1997; Rattan *et. al.*, 1998).

Los estudios también relacionan al locus *inhA* con la resistencia a isoniácida, el cual también ha sido relacionado con la co-resistencia a INH y Etionamida. El locus esta compuesto por dos fragmentos de lectura abierta (ORFs) que se llaman *orfI* e *inhA*, separados ambos por 21 pb. InhA es una enoil-ACP reductasa, la cual cataliza la reducción de la proteína transportadora 2-trans-acil-octenoil (proteína transportadora de ácidos grasos acinelónicos) y las proteínas de la biosíntesis de los esteres de enoil-CoA, de este modo activa la síntesis de la elongación de la cadena de los ácidos grasos (Figura 2) (Rattan *et. al.*, 1998; Lemus, 2007)

Se piensa que InhA usa como cofactor un NAD (H), por lo que una de las causas de la susceptibilidad a INH es la incorporación de iso-NAD, que es formada como consecuencia de la acción de KatG sobre INH, la que detendría la actividad enzimática de InhA bloqueando la síntesis de los ácidos grasos (Cole *et. al.*, 1994; Bastian y Portaels, 2000).

En cepas resistentes se ha encontrado transversiones en *inhA* que involucran, durante la transcripción de la proteína, el reemplazo de un aminoácido por otro, este tipo de mutaciones se ha hallado en distintas partes del locus. Alternativamente también se ha hallado mutaciones en las regiones promotoras putativas, que producirían una hiper expresión de InhA la cual condicionaría una resistencia a INH. Sumado a esto existiría alguna mutación en el gen *ndh*, la cual codifica la enzima NADH deshidrogenada, que lo lleva a sobre expresarse. Esta sobre-expresión aumenta la cantidad NADH intracelular lo que compensaría lo perdido durante la inactivación de KatG por INH y competiría con el iso-NAD (Figura 2) (Banerjee *et. al.*, 1994; Bergler *et. al.*, 1994; Bastian y Portaels, 2000; Lemus 2007).

En general, del 70 al 80% de las mutaciones relacionadas con la resistencia a INH son las que comprometen a *katG* y al locus *inhA*. Se han hallado otros genes relacionados con mutaciones para la resistencia como *kasA*, *ceoA*, *mabA*, *acpM*, *furA*, las cuales aún se hallan en estudio. (Cole *et. al.*, 1994; Rattan *et. al.*, 1998; Bastian y Portaels, 2000; Lemus, 2007)

3.4.2. Resistencia a Rifampicina (RIF)

Introducida en 1972 la rifampicina es una droga semisintética de amplio espectro y es extremadamente efectiva contra *M. tuberculosis*. Junto con INH poseen un alto poder bactericida y se difunde fácilmente a través de la membrana plasmática y la envoltura nuclear. Entre las registradas, la resistencia a rifampicina es la que menor probabilidad tiene en aparecer, sin embargo los mecanismos de selección genética ejercidas por un inadecuado régimen de medicación, ha aumentado esta probabilidad (Rattan *et. al.*, 1998; Lemus, 2007).

El blanco de la rifampicina es la RNA polimerasa, siendo su función específica la de inhibir la transición de la síntesis de pequeños oligoribonucleótidos a transcritos de longitud total (Ovchinnikov *et. al.*, 1981; Bastian y Portaels, 2000).

La RNA polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por 4 sub-unidades α , β , β' , σ los cuales son codificados por *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD* respectivamente. La rifampicina actúa directamente sobre la sub-unidad β por lo que la mutación en *rpoB* genera la resistencia hacia este antibiótico (Rattan *et. al.*, 1998).

Las mutaciones en el *rpoB* relacionados con la resistencia a RIF están ubicados dentro de una región central (*core*) de 81 pb, en la cual existen mecanismos de delección e inserción de unidades nucleotídicas las que generan la sustitución de aminoácidos. Los cambios en los codones His526 y Ser531 han sido reportados en 70% de los casos de resistencia a RIF. Otros tipos de resistencia a RIF son raros, pudiendo ser mutaciones en la región aminoterminal, así como cambios en la permeabilidad de la membrana que impediría el ingreso de la droga (Figura 2) (Rattan *et. al.*, 1998; Bastian y Portaels, 2000; Lemus, 2007).

3.4.3. Resistencia a Etambutol (EMB)

El EMB (dextro-2,2-(etil-diimino)-di-lonol) es una droga de origen sintético, se usa en el tratamiento contra la tuberculosis desde el año 1968. Su mecanismo de acción en la bacteria involucra la obstrucción de la formación de los componentes externos de la pared celular. El efecto sinérgico de la droga implica el aumento de la permeabilidad de

la pared celular la cual facilita el ingreso de otras drogas (Rastoggi *et. al.*, 1992; Rattan *et. al.*, 1998; Lemus, 2007).

Los efectos del EMB cesa ó impide la transferencia de los ácidos micólicos a la pared celular añadido a una acumulación intracelular de trialosa mono y di-micolato. El blanco de esta droga son las arabinosil transferasas, necesarias para la biosíntesis de los arabinogalactanos. Siendo imprescindible las uniones entre los ácidos micólicos con los arabinogalactanos para la formación del MAPc de la pared celular, una interrupción en la síntesis de los arabinogalactanos permitiría el aumento de permeabilidad en esta estructura (Takayama *et. al.* 1989; Sreevatsan *et. al.*, 1997).

El principio de la resistencia a EMB consiste en la sobre-expresión de las arabinosil transferasas. Estas transferasas son codificadas por los genes *emb* conformada por los ORFs *embC*, *embA*, *embB*, las cuales son transcritas en conjunto debido a la ausencia de secuencias intercistónicas, aunque se ha mencionado de la presencia de loops de origen secundario entre los productos de *embB* y *embA* lo que indicaría que ambos genes estarían regulados independientemente. Se cree que las proteínas *embCAB* están integradas a la pared celular y están encargadas de la síntesis de los arabinogalactanos y los lipoarabinogalactanos (Figura 2) (Belanguer *et. al.*, 1996; Telenti *et. al.*, 1997; Bastian y Portaels, 2000).

Otro de los mecanismos moleculares de la resistencia a EMB está conferido a la sustitución de codones de la región *embB*, como es el caso del codón Met306 que codifica Metionina que se sustituye por Valina, Leucina o Isoleucina (Rattan *et. al.*, 1998).

El 70% de las resistencias a EMB en *M. tuberculosis* se debe a la sobre-expresión de los genes *embCAB*, el otro 30% esta relacionado con los otros mecanismos mencionados, de los cuales varios no han sido totalmente estudiados (Rattan *et. al.*, 1998; Lemus, 2007).

3.4.4. Resistencia a Estreptomicina (SM)

La SM es una de las más antiguas drogas conocidas para el tratamiento de TB, fue introducida en 1944 y es un aminoglucosido que interfiere en la síntesis de proteínas procarióticas, produce errores de lectura en el código genético como son la inhibición de la iniciación y la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica durante la transcripción de ARNm (Figura 2) (Rattan *et. al.*, 1998; Lemus, 2007).

Aunque normalmente los mecanismos de resistencia a SM en otras bacterias es la acetilación de la droga por enzimas aminoglucosidas, esto no ocurre en las *micobacterias*. En *M. tuberculosis* estos mecanismos son atribuidos a mutaciones en el gen *rpsL* y en el operon *rrs*, que codifican la proteína ribosomal S12 y el rRNA 16S respectivamente (Douglass *et. al.*, 1993; Finken *et. al.*, 1993).

Las mutaciones en *rpsL* y *rrs* no están totalmente entendidas, aunque se ha hallado la presencia de alteraciones en los genes *rrs* relacionados a cambios de la permeabilidad de la membrana que dificultarían el ingreso de la SM al interior de la bacteria (Meier *et. al.*, 1996; Rattan *et. al.*, 1998)

3.4.5. Resistencia a Pirazinamida (PZA)

La Pirazinamida fue descubierta en 1952 como antibiótico para el tratamiento de la tuberculosis, e introducida en la quimioterapia a corto plazo en la década de 1980, tiene una actividad sobre *M. tuberculosis* de semidormancia, pero que es fuertemente sinérgica junto a la acción de INH y RIF, disminuyendo el tiempo de tratamiento de 12 meses a 6 meses (Rattan *et. al.*, 1998).

Mycobacterium bovis posee mecanismos regulares de resistencia a PZA, al poseer la enzima pirazinamidasa la cual hidroliza la PZA a ácidos pirizinoicos. Esta enzima es codificada por el gen *pncA*, la cual también se halla en *M. tuberculosis* pero en forma inactiva, la cual se activaría por la sustitución de los aminoácidos Cys138 por Ser, Gln141 por Pro, Asp63 por His y la delección de un nucleótido de guanina en la posición 162 y 288 (Scorpio *et. al.*, 1996; Zhang, 2005).

3.4.6. Resistencia a las Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas descritos en 1984, son antibióticos que han sido utilizados desde un inicio como terapia alternativa para la tuberculosis. Su blanco de acción son las DNA girasas (Gyr), las que son miembros de las DNA topoisomerasas del tipo II, las cuales tienen la función de introducir superenrollamientos negativos al DNA genómico para su cierre circular (Kirchhausen *et. al.*, 1985; Rattan *et. al.*, 1998).

Gyr es un heterotrómero formado por A₂B₂ los cuales son codificados por *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Las fluoroquinolonas como el ácido nalidíxico inhiben la acción de superenrollamiento y relajación del DNA, acción efectuada por Gyr. El blanco de las Quinolonas es la GyrA, la cual como consecuencia inhibe la religación del DNA e imposibilita un efectivo bloqueo transcripcional (Figura 2), llevando a la bacteria a la muerte (Rattan *et. al.*, 1998).

Se menciona que los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas serían la sustitución de aminoácidos en *gyrA* (en los residuos de 88 al 94), se menciona también cambios en la permeabilidad de la pared celular que ayudaría a la resistencia (Rattan *et. al.*, 1998).

La siguiente figura fue elaborada en el presente estudio en base a los mecanismos antes mencionados:

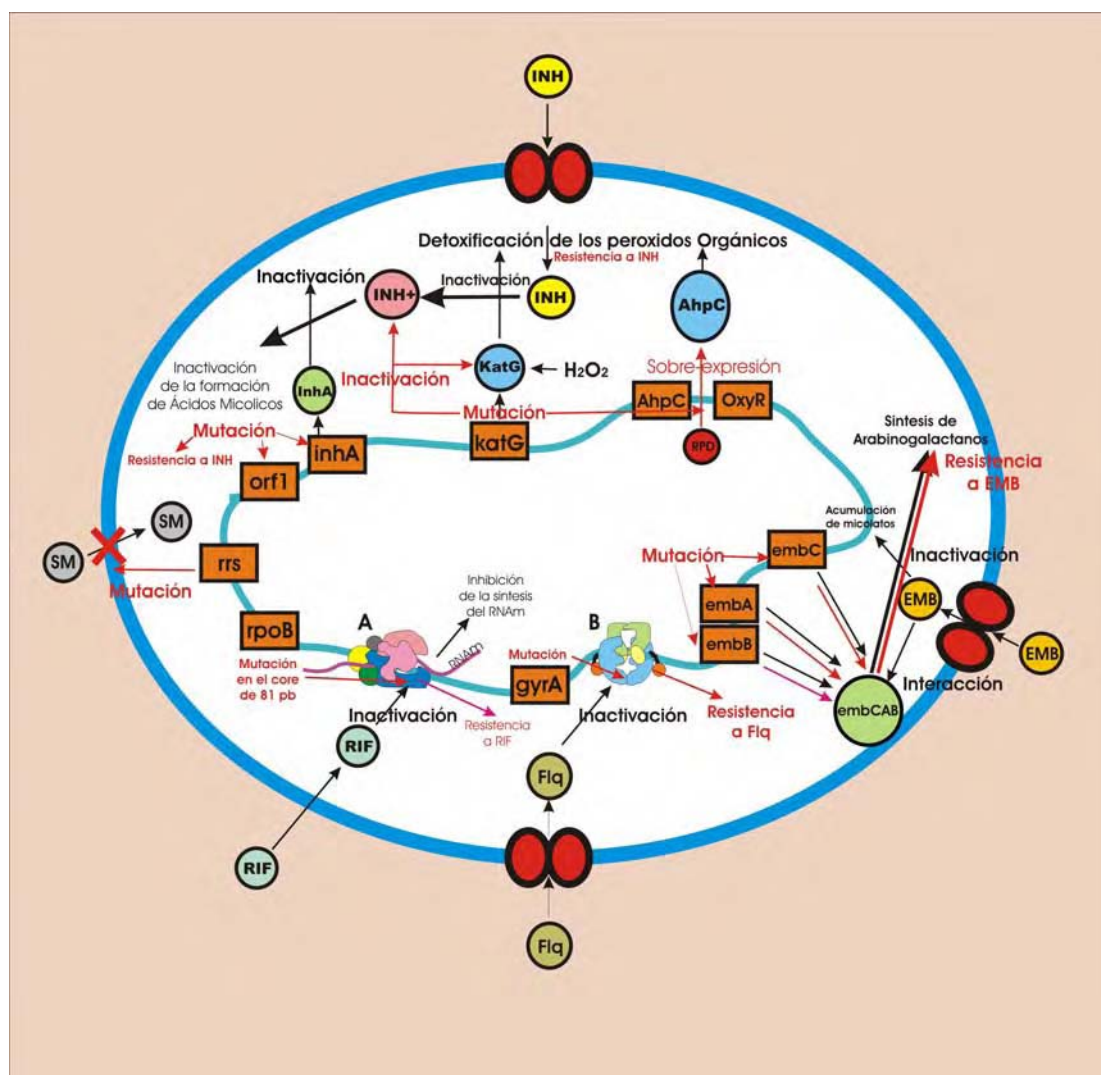


Figura 2. Esquema de los mecanismos moleculares de la resistencia a Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), Estreptomicina (SM), Etambutol (EMB), y a las Fluoroquinolonas (Flq). Se representan dentro del esquema a la RNA polimerasa (A) y a la Girasa (B), las sub-unidades afectadas son las que se señalan con las flechas.

3.5. Epidemiología molecular de la tuberculosis: Contexto Histórico

La historia de las técnicas y metodologías moleculares en torno a la epidemiología de *M. tuberculosis* es abundante y amplia, teniendo un origen incierto y continuando con hallazgos fortuitos que fueron reforzados con conocimientos básicos que permitieron hallar una técnica estandarizada y reproducible.

A partir de 1985 los estudios moleculares comenzaron a tener un giro por el descubrimiento de la técnica de la Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), aunque este cambio se inició en 1980 con la descripción de los estudios de los polimorfismos genéticos obtenidos mediante el uso de las enzimas de restricción

(RFLP). Teniendo como base estas dos técnicas la aparición de nuevas metodologías para distinguir polimorfismos genéticos entre poblaciones fueron *in crescendo* tanto para estudios de células eucarióticas y procarióticas. Más no era lo mismo con *M. tuberculosis*, cuya dificultad radicaba en que aún no se tenía muy claro la composición de su genoma, del cual aún no se había secuenciado completamente, a pesar que desde 1975 Frederic Sanger ya había publicado su protocolo de secuenciación, sumado a que en aquella época esta bacteria era considerada de gran importancia epidemiológica y patológica (David, 1970)¹⁵. Por esta circunstancia, no se podía identificar una secuencia, un gen o un locus que permita ver una diferenciación genética entre poblaciones bacterianas, y mucho menos crear una técnica repetitiva relacionado a un gen o una secuencia y fácilmente estandarizada.

En 1990 Thierry *et. al.*, identificaron una secuencia de inserción en *M. tuberculosis* que pertenecía a la familia IS3, ellos manifestaron la posibilidad de la creación de una técnica que permitiera usarse para el diagnóstico diferencial de esta bacteria (Thierry *et. al.* 1990).

En 1993 van Soolingen publicó una serie de posibles métodos para el uso epidemiológico en TB. La investigación probó todas las técnicas de RFLP que se podían realizar sobre *M. tuberculosis*, algo que después van Soolingen nos tendría acostumbrados en sus investigaciones (Kremer *et. al.*, 1999), en la cual mediante técnicas basadas en la hibridización por Southern Blot, se hibridaron los genomas de *M. tuberculosis* digeridos por las enzimas de restricción *AluI* y *PvuII*, con las secuencias de inserción IS1081 e IS6110 y con secuencias repetitivas PGRS y DR, en todas las combinaciones posibles. Solo a las secuencias repetitivas le atribuye importancia en estudios evolutivos, mientras que las secuencias de inserción tienen mayor diferenciación en cuanto a los polimorfismos genéticos, pero ninguno de ambos puntos de vista le satisface, más a su criterio añade que los estudios en la secuencia de inserción IS6110 pueden tener mayor importancia epidemiológica (van Soolingen, 1993).

¹⁵ Los primeros genomas en ser secuenciados fueron los de importancia económica, como lo fue *Sacharomices cerevisiae*, recién en la década de 1990 fue secuenciado el genoma de *M. tuberculosis*

En ese mismo año van Embden publica una investigación en el que específicamente estudia la secuencia de inserción IS6110, en la que demuestra el alto polimorfismo genético y la alta viabilidad de implementación de una metodología de RFLP para esta secuencia (van Embden, 1993).

Al parecer van Soolingen reforzó su hipótesis sobre la secuencia IS6110 ya que en 1994 publica la metodología que se llamaría después RFLP-IS6110 (van Soolingen, 1994), aunque hay discrepancias por la autoría del método. En el 2000 se aprueba la patente de la técnica estandarizada de van Embden (van Embden *et. al.*, 2000).

La secuencia IS6110 se halla repetido 16 veces en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, siendo 14 de esas repeticiones iguales unas de otras. Es de conocimiento que el tiempo promedio de estabilidad de un patrón IS6110 es de 2,5 años (Comunicación personal con Diaz, Instituto Pedro Kouri de Cuba, 15 de Abril del 2008) y se especula que para la ocurrencia de una transposición de esta secuencia deben de pasar 58 años (Cave *et. al.*, 1991). Como se menciono anteriormente se han hallado la presencia de la bacteria en momias peruanas de hace 1000 años de antigüedad (Salo *et. al.*, 1994)

A partir del descubrimiento de la secuencia de inserción IS6110 como un instrumento para los estudios epidemiológicos, comenzaron a aparecer otras técnicas que deseaban reemplazar la recientemente planteada RFLP-IS6110, la cual a pesar de ser una técnica “sencilla” poseía algunas dificultades, como son la necesidad de DNA de pureza y concentración, además de poseer un proceso de hibridización con muchos pasos y con varios días de ejecución.

En un comienzo estas nuevas técnicas se basaban en el uso del PCR, en 1993 Plykaitis *et. al.*, publica una metodología basada en los polimorfismos de las distancias entre las secuencias IS6110, esto lo logro al crear *primers* que se situaban de forma inversa a los flancos de esta secuencia de inserción.

Luego se introdujo la idea de usar las técnicas de PCR y digestión con enzimas de restricción, ejemplo de ello es la metodología de PCR mixto (Mixed linker PCR) de Haas *et. al.*, 1994 en el que estudia el polimorfismo genético de los productos de

diferentes *primers* para la secuencia IS6110 unido a digestiones de la enzimas de restricción *HhaI* usada antes y después del proceso de PCR.

En 1995 Friedman *et. al.*, crea el método de PCR de elementos doblemente repetitivos (DRE), en el cual usa primers situados en forma inversa en el interior de IS6110 junto con primers ubicados en el interior de las secuencias PGRS, en los que el señala que se ubican los DRE.

Prod'hom *et. al.*, en 1997 vuelve a usar los primers diseñados por Plykaitis a los que denomina IS1 e IS2 en DNA digerido por la enzima *SalI* y los usa en conjunto con primers denominados Salgd y Salpt, luego hace un nested PCR usando los primers que se hallan en las secuencias directamente repetitivas (DR) a los que llama DRa y DRb, con los que se hallan dentro de la secuencia IS6110 (IR1). Esta técnica la denomina PCR mediado por ligación (ligation-mediated PCR/LMPCR)

En el mismo año se crea el Spoligotyping (Kamerbeck *et. al.*, 1997), el método es basado en el polimorfismo cromosomal del locus DR, en la cual el genoma de *M. tuberculosis* contiene un número de secuencias repetitivas cortas intercaladas con espacios de secuencias no repetitivas. La metodología consiste en la lectura de estos espacios entre las secuencias repetitivas a los cuales el autor denomina espacios oligotípicos (spacer oligotyping) o spoligotyping, los diferentes polimorfismos se miden según la ausencia o presencia de estos espacios.

Desde 1985 comenzaron los estudios en las secuencias repetitivas en tándem en número variable (VNTR) dentro de los genes de la mioglobina humana (Jeffreys *et. al.*, 1985). Más recién en 1998 se identificaron VNTRs para *M. tuberculosis*, siendo los primeros en identificarse las secuencias exactas repetitivas en tándem (ETR) y las secuencias repetitivas en tándem de mayor polimorfismo (MPTR), descritas por primera vez por Frottingham *et.al.*, luego se fueron implementando nuevas mejoras y se encontraron nuevas secuencias como es en el caso del método MIRU-VNTR PCR (Mathema *et. al.*, 2006)

El gran problema de estos métodos es que no poseían el nivel de polimorfismo que daba la técnica de RFLP-IS6110, además de que la gran mayoría tenían una baja repetitividad

como lo son en varios de los casos de las metodologías basadas en PCR o crean falsos positivos como es en los casos del Spoligotyping (Kremer *et. al.*, 1999; Mathema *et. al.*, 2006). Una de las razones por la cual la técnica de RFLP-IS6110 se convirtió en “gold-standard” para los estudios epidemiológicos en TB.

En el año 2004 fue publicado el artículo en que se basa esta investigación “*PCR-Based Genotyping of Mycobacterium tuberculosis with NewGC-Rich Repeated Sequences and IS6110 Inverted Repeats Used as Primers*” (Kotlowski *et. al.*, 2004).

En la descripción del trabajo se menciona la utilización de los *primers* IS1 e IS2, inicialmente utilizadas por Plykaitis, las cuales como se menciono anteriormente son *primers* que se ubican inversamente en los flancos de la secuencia IS6110. Estos *primers* la usa en combinación con un primer Mtb (Mtb1 o Mtb2), los cuales se caracterizan por su alta repetitividad de secuencias CG, estas secuencias son únicas para algunas especies del género *Mycobacterium* y en su mayoría se hallan dentro de las secuencias PGRS.

Los hallazgos de esta investigación tuvieron polimorfismos genéticos similares a los obtenidos con los estudios con RFLP-IS6110, pero además brinda información de la cantidad de secuencias repetitivas como lo que se obtiene con el Spoligotyping, pero con mayor poder discriminatorio.

En el Perú estas investigaciones epidemiológicas moleculares en *M. tuberculosis* con la técnica RFLP-IS6110 han sido solo 2 (Baldeviano *et. al.*, 2003; Capcha *et. al.* 2005), de la que destaca la realizada por Capcha *et. al.* (2005) en pacientes enfermos del distrito de Villa Maria del Triunfo y del Hospital Maria Auxiliadora, en el cual hallaron una gran dispersión de genotipos con una baja clonalidad, conclusiones que desgraciadamente ni comentaron, ni discutieron dado que la investigación fue meramente descriptiva. Luego de esta investigación no hay otras similares.

4. Materiales y Métodos

4. Materiales y Métodos

4.1. Material Biológico

4.1.1. Cepa de Referencia

Para esta investigación se empleo la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv del Instituto Pasteur como referencia, perteneciente a la colección del Laboratorio de Tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.¹⁶

4.1.2. Cepas Clínicas que se estudiaron

En el presente trabajo se estudiaron 49 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con diagnóstico de **fracaso terapéutico**¹⁷ o que tuvieron contacto con un paciente que poseía una cepa con algún tipo de resistencia, procedentes de la red de establecimientos de Essalud de Lima.

A continuación se detallan los grupos estudiados

4.1.1.1. Estudio epidemiológico molecular de transmisión de tuberculosis de Lima y Callao

Las 49 cepas de *M. tuberculosis* analizadas en este estudio fueron aisladas de muestras de pacientes con diagnóstico de fracaso terapéutico o que registran en su historia clínica algún riesgo de contagio con una cepa resistente a algún fármaco, entre los meses de diciembre del 2006 y abril del 2007.

4.1.1.2 Estudio epidemiológico molecular de transmisión de tuberculosis entre pacientes que poseen cepas resistentes a fármacos de *M. tuberculosis*

Se estudiaron 31 cepas de *M. tuberculosis* resistente a algún fármaco de los cuales 15 procedían de pacientes con diagnóstico de TB MDR (resistencia a Isoniacida y Rifampicina) y 6 a TB MDR plus¹⁸ (MDR asociada a resistencia a drogas de segunda línea¹⁹). Estas muestras provienen de toda el área de estudio.

¹⁶ Cepa sensible a todas las drogas

¹⁷ Paciente que después de cinco meses de comenzado el tratamiento mantiene sus cultivos positivos para tuberculosis (WHO, 1997)

¹⁸ Definición descrita por el Dr. Michael Iseman de la *National Jewish Health* de los Estados Unidos (Comunicación personal, 30 de abril del 2008)

¹⁹ Estas definiciones fueron discutidas por Ernesto Montoro del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri de Cuba (Comunicación personal, 30 de abril del 2008)

4.1.1.3. Estudio epidemiológico molecular de transmisión de tuberculosis entre personas seronegativas y seropositivas al VIH asociada a tuberculosis

Se analizaron 8 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes seropositivos para VIH con tuberculosis y 41 cepas de pacientes seronegativos.

4.2. Material de Laboratorio

4.2.1. Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos para la presente investigación: Un vortex, una cámara de flujo laminar (Nivel 2), una cámara de baño de agua de rango de 50°C a 100°C, una microcentrífuga, un termociclador y una cámara de electroforesis submarina.

4.2.2. Reactivos

4.2.2.1. Para la extracción y purificación de DNA

Se utilizó cloroformo y agua destilada.

4.2.2.2. Para el proceso de amplificación del DNA

Se empleó *Taq* platinum 500 U (5U/μl) (Invitrogen), buffer PCR 10X *minus* Mg [(200mM Tris HCl (pH 8,4), 500 mM HCl) (Fermentas)], MgCl₂ 25mM (Fermentas), dNTPs 50mM (Invitrogen), UltraPure™ DNase/RNase-free *distilled water* (Invitrogen), primer IS1 10mM (5_-CGG-ACT-CAC-CGG-GGC-GGT-TCA) (Invitrogen), primer IS2 10mM (5_-CGG-ACA-TGC-CGG-GGC-GGT-TCA) (Invitrogen), primer Mtb2 10mM (5_-CGG-CGG-CAA-CGG-CGG-CA) (Invitrogen).

4.2.2.3. Para el proceso de electroforesis

Se utilizó agarosa al 1% para electroforesis (Invitrogen), buffer de carga (SDS 0,5%, glicerol 25%, EDTA 25mM, azul de bromofenol 0,05%, agua bidestilada), buffer TAE 0,5X (Tris acetato EDTA), el marcador molecular “Mass Ruler DNA ladder” (Fermentas) y bromuro de etidio.

4.3. Métodos

4.3.1. Estudio de la susceptibilidad a las drogas antituberculosas

Las pruebas de susceptibilidad a las drogas antituberculosas: Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), Estreptomina (SM), Etambutol (EMB), Kanamicina (KN), Ácido para-amino-salicílico (PAS), Tioacetazona (TIO), fueron realizadas, utilizando el método de las proporciones múltiples de Canetti (Canetti *et. al.*, 1963) y para la determinación de resistencia a Pirazinamida (PZA) la prueba de la Pirazinamidasa (Wayne, 1974), estos se practicaron en todas las cepas en estudio.

4.3.2. Recolección de los datos clínicos epidemiológicos

Se utilizaron fichas para recoger información de datos clínicos con importancia epidemiológica mediante la revisión de las Historias Clínicas de los pacientes de los archivos de los Hospitales Guillermo Almenara Irigoyen y Alberto Sabogal. Los datos que se registraron fueron: Edad, sexo, lugar de residencia, antecedente de enfermedad tuberculosa (nueva o antigua), tipo de tratamiento anti-tuberculosis, contacto con enfermos con TB MDR, serología para VIH y tipo de resistencia a fármacos antituberculosos (inicial o adquirida).

4.3.3. Genotipaje Basado en PCR

Esta técnica fue usada según Kotlowski *et. al.*, 2004, y modificada por el autor, con los siguientes cambios: i) Se empleo DNA genómico total en lugar de DNA digerido con la enzima PvuII, y ii) En el Protocolo de PCR se implementaron dos ciclos de amplificación y a su vez se modifico la temperatura de hibridización de 66°C a 64°C en el primer ciclo de amplificación y 62°C en el segundo ciclo

4.3.3.1. Método de purificación de ADN de las micobacterias

1. Se agregó 0,2 ml de agua destilada en un tubo cónico de centrifuga estéril
2. Se transfirió 4 a 5 colonias de un cultivo abundante de *M. tuberculosis* a la preparación anterior.
3. Se añadió cloroformo (0,2 ml) y se agitó en un vortex por 20 a 40 segundos.
4. Se incubó a 80°C por 20 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente o en congelación a -20°C por 20 minutos o toda la noche.
5. Se extrajo la parte líquida y se introdujo en un tubo microcentrífuga, se desecho el precipitado.

6. Se centrifugó a 12,000 rpm, tomando el sobrenadante donde se encuentra el DNA requerido.
7. Se guardó a -20°C hasta su uso.

4.3.3.2. Determinación de la concentración del ADN extraído por espectrofotometría (Método por Hipercromicidad del ADN mediante el uso del NaOH 10N)

A. Para la muestra blanco

En un tubo de microcentrífuga se agregó 1,8 ml de agua bidestilada y 0,2 ml de NaOH 10N.

B. Para las muestras pruebas

En un tubo de microcentrífuga se agregó 1,780 ml de agua bidestilada y 0,2 ml de NaOH 10N y 0,02 del ADN extraído.

Nota: La lectura se realizó por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda. Se tomo el parámetro en el que por cada 27 OD existía 1 mg/ml de ADN.

4.3.3.3. Preparación de los primers

Cada uno de los primers a usar (IS1, IS2 y Mtb2), se preparó a una concentración madre de 100 µM, usando como diluyente el Buffer TE. Se separó en alícuotas de 10 µM para el uso cotidiano.

4.3.3.4. Condiciones para el PCR

1. Preparación de la mezcla de reacción:

Buffer <i>Taq</i> polimerasa 10X	2,5 µl
Solución de MgCl ₂	2 µl
Mezcla de dNTP (cada dNTP a 0,2 mM)	0,8 µl
Primer IS1 (25 pmol)	0,75 µl
Primer IS2 (25 pmol)	0,75 µl
Primer Mtb2 (25 pmol)	0,75 µl

2. Se adicionó 0,2 µl de *Taq* polimerasa platinum (1U) por reacción a la mezcla de PCR. Se mezcló con vortex y se mantuvo en hielo.
3. Se transfirió alícuotas de 7,75 µl de la mezcla a tubos limpios y se adicionó 10 µl de la solución de ADN amplificado por PCR.
4. Se mezcló y dio un golpe de centrífuga y se mantuvo las muestras en hielo hasta su uso.

5. Se usó el siguiente programa:

94 °C x 5 min		
94 °C x 1min	}	
62 °C x 1 min	}	I. 18 ciclos
72 °C x 2 min	}	
94 °C x 1 min	}	
64 °C x 1 min	}	II. 18 ciclos
72 °C x 2 min	}	
72 °C x 10 min		

6. Se analizó el resultado de la amplificación por electroforesis de geles de agarosa al 2% en buffer TAE o se guardó las muestras a -20°C

4.3.3.5. Separación de los productos del PCR por electroforesis

1. Se peso 1,8 g de agarosa y se añadió 90 ml del buffer TAE para un molde de gel de 14 x 13 cm. Se calentó el buffer con la agarosa hasta su total dilución.
2. Se dejo enfriar por unos minutos, luego se preparó el molde del gel con su peine. Se vertió la totalidad de la agarosa disuelta y se dejo solidificar bien.
3. Se quitó el peine y se coloco el gel en la cámara electroforética con buffer TAE.
4. Se aplico 10 µl de cada muestra con 0,2 µl de buffer de carga en un pocillo diferente en el gel, se coloco los marcadores a ambos extremos.
5. Se tapó la cámara de electroforesis submarina, se conecto a una fuente de poder y se realizó una corrida electroforética de 120 min. a 60 V.
6. Terminada la corrida se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio al 0,01% aproximadamente, por 15 minutos. Finalizado el tiempo se lavo el gel con agua.
7. Se colocó el gel en el transiluminador y se realizó la toma de las imágenes correspondientes.

4.3.4. Visualización y análisis de los patrones genéticos

Se aplicó el software Bionumerics 5.0 (Applied-maths) para la obtención de los dendogramas que fueron base del estudio epidemiológico y estadístico. Usando el coeficiente de similaridad de Dice, fueron agrupados en *clusters* (también llamados agrupamientos o conglomerados) las cepas que el programa consideraba que poseían patrones iguales.

Para fines de orden en la investigación, se definieron dos conceptos de agrupación de la siguiente forma: A los grupos de genotípicos que poseían el 80% o más de similitud se les denominó **agrupaciones** y **clusters** a los que presentaban el 100% de similitud.

4.3.5. Análisis Estadístico

De acuerdo a lo postulado por van Soolingen *et. al.*, (1999) y lo recomendado por Suffys (Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria Oswaldo Cruz Institute-Brasil, Comunicación personal, 5 de Noviembre del 2007), el análisis estadístico de riesgo, se realizó utilizando los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes, el tipo de resistencia (resistencia primaria o secundaria) y las agrupaciones de los patrones genotípicos formados en el dendograma, para lo que se usó el *Odds ratio*²⁰, el valor p, el Intervalo de confianza, añadiéndose el estudio del Riesgo Relativo como complementario al *Odds ratio*. Además se tomo la hipótesis de van Soolingen, en el que refiere que las agrupaciones obtenidas, en el dendograma de los polimorfismos genéticos, son una evidencia epidemiológica de una transmisión activa de la enfermedad²¹ (van Soolingen *et. al.*, 1999).

4.3.6. Estudio Bioinformático

Para estudiar el genoma de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* publicado por el Instituto Sanger y la emulación de la técnica de Genotipaje basado en PCR sobre la base de datos antes citada, se utilizaron los softwares: Genamics Expresión 1.1 (Genamics Company), Lasergene 7.2 (DNASTAR, Inc.) y Artemis Release 9 (Sanger Institute) para el estudio del genoma y el análisis *in silico* de la genotipificación basada en PCR; Mauve 2.0.0 (Aaron *et. al.*, 2004) para la construcción de alineamientos múltiples en el estudio de similitudes entre los genomas; Phylodraw 0.8 (Choi *et. al.*, 2000) para la generación de árboles filogenéticos bajo los resultados del programa Mauve 2.0.0; y Multi Variate Statistical Package (MVSP) 3.13g (Kovach Computing Services) para la generación de dendogramas según los resultados del análisis *in silico*.

²⁰ La palabra *Odds ratio* no posee traducción pero se puede interpretar como: razón de ventaja, razón de chances, razón de momios o razón de productos cruzados.

²¹ Para fines estadísticos, este término se denominó contagio, por lo que se distinguieron los factores de contagio y no contagio.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Estudio epidemiológico de la tuberculosis

5.1.1. Descripción de la población en estudio

La población en estudio fue de 49 personas, estuvo conformada de 29 (59,18%) pacientes varones y 20 (40,82%) mujeres infectados con TB (Tabla 1). Todos tenían diagnóstico fracaso al tratamiento contra *M. tuberculosis* o que tuvieron riesgo de contagio con una cepa con algún tipo de resistencia. Se determinó que del total de enfermos, el 26,53% eran menores de 30 años y el 73,47% eran mayores de 30 años (Tabla 1), además se estableció que el 75,51% residía en Lima y el 24,49% en el Callao (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia y porcentaje del sexo, edad y lugar de residencia de la población. Se ha constatado que existe un mayor porcentaje de varones que de mujeres dentro de la población en estudio. Además se ha observado que existe un mayor porcentaje en los pacientes que tienen más de 30 años, y existe un mayor porcentaje de pacientes residen en Lima

	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	29	59,2
Femenino	20	40,8
Total	49	100,0
<= a 30	13	26,5
> a 30	36	73,5
Total	49	100,0
Lima	37	75,5
Callao	12	24,5
Total	49	100,0

Asimismo se registró que 28 (57,14%) casos referían antecedentes de enfermedad por TB y 11 (42,86 %) casos no poseían antecedente (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia y porcentaje por antecedentes de enfermedad por TB de la población. Se ha visto que el 57% de los pacientes presentaron TB anteriormente

	Frecuencia	Porcentaje
Si	28	57,1
No	21	42,9
Total	49	100,0

De la misma manera, se observó que 16,33% (8 casos) del total de enfermos presentaron serología positiva para el virus de la inmunodeficiencia humana VIH (+) (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia y porcentaje por presentación de serología positiva para el VIH de la población. De los 49 pacientes, el 16% son pacientes portadores del VIH.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	8	16,3
No	41	83,7
Total	49	100,0

La distribución de los pacientes en el estudio epidemiológico se dio en base a sus lugares de residencia. Más para el análisis visual de la distribución geográfica de los casos, se consideró el establecimiento de salud donde se atendía²², el cual fue de la siguiente manera: 4 (8,16%) pertenecen a la Red Asistencial Rebagliati, 24 (48,98%) de la Red Asistencial Almenara, y 17 (34,69%) de la Red Asistencial Sabogal. Además de los mencionados hubo 4 casos cuyas historias clínicas no se encontraron en el archivo.

5.1.2. Distribución geográfica de los agrupamientos

El 77,78% de los agrupamientos estudiados correspondían a pacientes que residen en Lima y Callao. Observándose en la mayoría de los *clusters* la presencia de un paciente de Lima con otro del Callao, relación epidemiológica planteada como un supuesto a ser estudiado, caso contrario fue lo que se observó con dos *clusters* compuestos por pacientes que residían dentro de la provincia de Lima. Correspondiendo uno de ellos al caso de dos hermanos que vivían juntos, y el otro a dos pacientes que acudían al mismo centro de atención del seguro social.

Como se mencionó los pacientes provienen de las tres redes asistenciales de Essalud, los cuales se señalan en la figura 5 como posibles focos donde se encuentran estas cepas²³.

²² La distribución se dio de esta manera dado que algunos pacientes presentaban más de un domicilio, o en algunos casos no habían datos exactos del domicilio tan solo la referencia a la provincia que pertenecían: Lima o Callao.

²³ No se tomó en cuenta el lugar exacto de residencia de los pacientes, dado de que en muchos casos no se tenía una referencia exacta de una dirección domiciliaria y en otros casos el paciente presentaba 2 lugares de residencia.

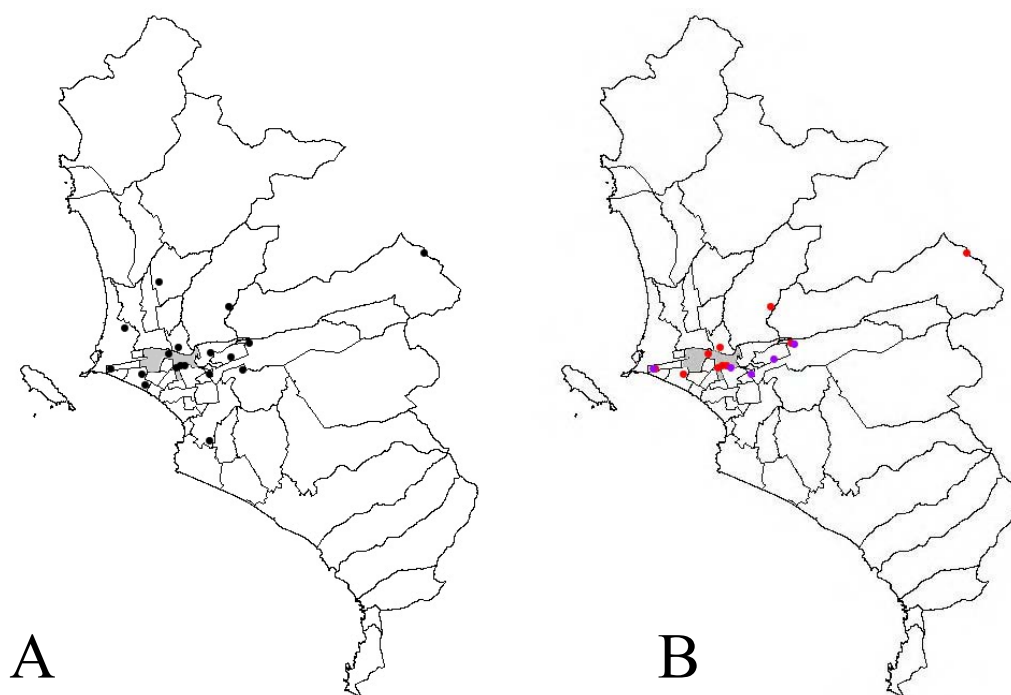


Figura 5. La figura A muestra los lugares de distribución de todos los pacientes estudiados según su centro de salud de referencia. La figura B muestra la distribución de los pacientes MDR y MDR plus, siguiendo el criterio anterior, los puntos rojos representan la presencia de cepas MDR y los puntos lilas, la presencia de cepas MDR plus. El área sombreada corresponde al Área de Lima Cercado.

La distribución de las cepas dentro del mapa (Figura 1), a pesar de pertenecer a una población relativamente pequeña, cubre gran parte de Lima metropolitana, focalizándose mayormente dentro de Lima Cercado y alrededores.

No se hallaron vestigios de alguna presencia de “brote” de una infección, a pesar de haber una población considerable de infectados con TB dentro de Lima Cercado, La Victoria y Rímac. La distribución de los perfiles genéticos, como se muestra en la Tabla 16, es indiferenciada al lugar de residencia de los pacientes y al lugar de referencia de su centro de salud.

En referencia a las cepas MDR y MDR plus, como se observa en la figura 5 B, las cepas MDR se hallan localizadas justo en los lugares con una alta densidad de TB, marcándose con 5 puntos rojos. El caso más alejado fue aislado de un paciente que procedía del distrito de San Juan de Lurigancho.

Los casos de los pacientes MDR plus, se distribuyen linealmente desde el distrito de Vitarte, cruzando por Santa Anita, la Victoria y Lima, hasta el Callao.

5.1.3. Susceptibilidad a antimicrobianos

Los resultados del estudio de susceptibilidad antimicrobiana demostró que 18 cepas (36,74%) eran sensibles a todas las drogas y 31 (63,26%) mostraban resistencia a alguna de las drogas, de los cuales 4 (12,9%) eran resistentes a una droga, 3 (9,7%) a dos drogas, 3 (9,7%) a tres drogas, 15 (48,4%) eran MDR y 6 (19,4%) eran MDR asociadas asociada a resistencia a drogas de segunda línea, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias y porcentajes de los tipos de resistencia a drogas de las cepas. Los mayores porcentajes pertenecen a las cepas sensibles y MDR.

	Frecuencia	Porcentaje
Sensible	18	36,7
Resistencia 1 antibiótico	4	8,2
Resistencia 2 antibióticos	3	6,1
Resistencia 3 antibióticos	3	6,1
MDR	15	30,6
MDR plus	6	12,2
Total	49	100,0

Los niveles de resistencia halladas fueron del 48,98% (24 casos) para Isoniacida, 46,94% (23 casos) para Rifampicina, 48,98% (24 casos) para Estreptomicina, 30,61% (15 casos) para Etionamida, 12,24% (6 casos) para Kanamicina, 8,16% (4 casos) para Ácido p-amino salicílico, 26,53% (3 casos) para Tioacetazona y 22,45% (11 casos) para Pirazinamida.

Casos MDR

De los 15 pacientes con cepas de *M. tuberculosis* MDR, 8 (53,33%) correspondieron al sexo masculino y 7 (46,67%) al sexo femenino, cuyas edades oscilaban entre los 15 y 75 años. Se registró la ubicación de sus lugares de residencia dentro de las provincias de Lima (88,24%) y el Callao (11,76%) y se observó que el 42,86% de los pacientes que presentaba antecedentes de tratamiento por TB eran TB MDR. Se detalla además, la presencia de 3 pacientes seropositivos para el VIH asociados con TB MDR (Tabla 5).

Casos MDR plus

De los seis pacientes que poseían cepas MDR plus, 4 (66,67%) eran varones y 2 (33,33%) eran mujeres, cuyas edades oscilaban entre los 15 y 75 años. Todos los pacientes devenían de un tratamiento previo contra la tuberculosis y eran seronegativos para el VIH. Cinco (83,33%) de estos pacientes residían en Lima y uno (16,67%) en el Callao (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencias y porcentajes de los casos MDR y MDR plus. Con respecto a los casos MDR los mayores porcentajes pertenecen a las personas menores de 30 años, a los residentes en Lima y a las personas con VIH+. Y en los casos MDR plus los mayores porcentajes pertenecen a las personas menores de 30 años, a los residentes en Lima y a las personas VIH-

		Sexo		Edad		Residencia		VIH	
		F	M	>30	<30	Lima	Callao	+	-
MDR	FREC	7	8	11	4	13	2	3	12
	%	46,7	53,3	73,3	26,7	88,2	11,8	20,0	80,0
MDR plus	FREC	2	4	5	1	5	1	0	6
	%	33,3	66,7	83,3	16,7	88,3	16,7	0	100,0

Casos VIH/TB

De los ocho pacientes con la asociación VIH/TB, 3 (37,5%) presentaban cepas de *M. tuberculosis* sensibles a todas las drogas estudiadas y 5 (62,5%) poseían cepas resistentes a algún fármaco, de los cuales 3 eran MDR, procedentes de dos varones y una mujer, siendo este último caso una enferma con antecedente de tratamiento anterior por tuberculosis (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias y porcentajes de los casos VIH/TB. Los mayores porcentajes pertenecen a las personas de sexo masculino, a los menores de 30 años y a los residentes en Lima.

		Sexo		Edad		Residencia		Resistencia antibioticos	
		F	M	>30	<30	Lima	Callao	S	R
HIV/TB	FREC	1	7	6	2	8	0	3	5
	%	12,5	87,5	75	25	100,0	0	37,5	62,5

Resistencia Inicial y Adquirida.

Se registró la presencia de **6 casos** de resistencia inicial y **25 casos** de resistencia adquirida (Tabla 7). Observando en los casos de resistencia inicial la presencia de 4 varones y 2 mujeres, de los cuales 3 eran seropositivos para VIH. Y en el caso de resistencia adquirida a 15 varones y 10 mujeres, siendo 2 de ellos seropositivos para VIH.

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de los datos de resistencia inicial de la población. De todos los pacientes, el 12% presento resistencia inicial y el 51% presento resistencia adquirida.

		Frecuencia	Porcentaje
Resistencia Inicial	Si	6	12,2
	No	43	87,8
	Total	49	100,0
Resistencia Adquirida	Si	25	51,0
	No	24	49,0
	Total	49	100,0

5.2. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis

5.2.1. Cuantificación del ADN Genómico

En las 49 cepas estudiadas se obtuvo 181,48 µg/ml como promedio de ADN de todas las muestras, determinadas mediante metodología de hipercromicidad. La integridad de la misma fue cualificada visualmente mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 6).

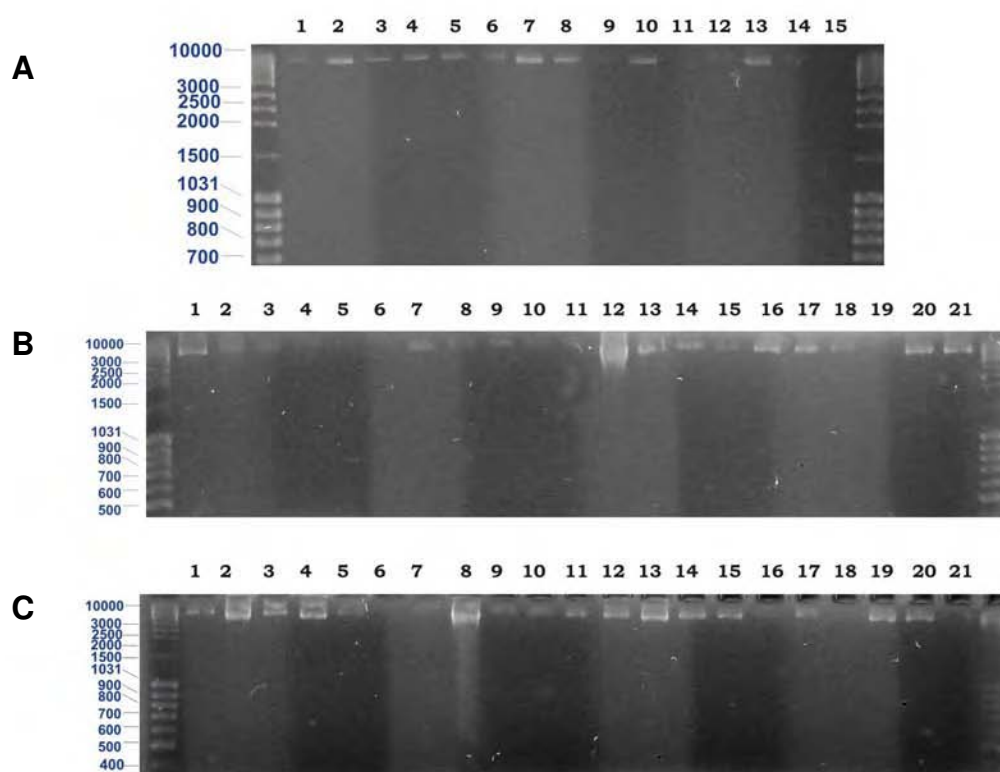


Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa (1%) de los ADN genómicos de los aislados de *M. tuberculosis*.

A. Líneas 1-15, MT020 - MT035. **B.** Línea 1, 11 y 21, H37Rv; líneas 2-10, MT036-MT044; línea 12, genoma de una cepa MDR (cepario HNGAI); líneas 13-21, MT002-MT010. **C.** Líneas 1 y 10, H37Rv; líneas 2-9, MT011-MT018; línea 11, genoma de una cepa MDR (cepario HNGAI); líneas 12-20, MT047-MT055; línea 21, vacía. Los números de la izquierda indican el tamaño de los fragmentos del marcador molecular utilizado.

5.2.2. Análisis del Genotipaje basado en PCR

Mediante el análisis de genotipaje basado en PCR de las cepas de *M. tuberculosis* (Figura 7 y Figura 8), se obtuvieron 42 tipos diferentes de perfiles y 10 *clusters*. El número de bandas para cada perfil estuvo en el rango de 7 a 1 banda(s). Seis de los perfiles encontrados mostraron solo una banda, de las cuales cuatro correspondían a cepas MDR., y dos a cepas sensibles a todas las drogas que pertenecían a una trabajadora de salud (Hospital Almenara), y a una niña de quince años²⁴.

Ningún perfil se asemeja al control negativo, y existieron dos casos en el que, en una suposición personal, hubo superposición de perfiles producto de la amplificación de varias secuencias de un mismo o cercano peso molecular de dos o quizás más cepas de *M. tuberculosis* procedente de un solo paciente²⁵.

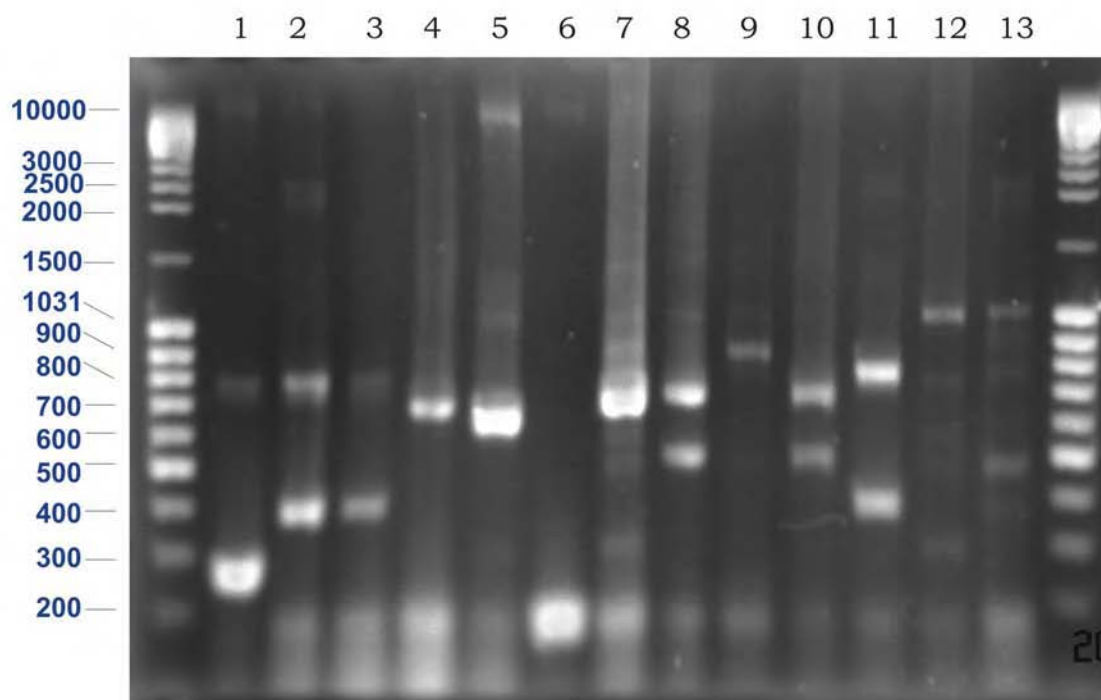


Figura 7. Patrón genotípico basado en PCR. Electroforesis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR. Líneas 1-7, MT038-MT044; Líneas 8-13, MT047-MT052. Los números de la izquierda indican el tamaño de los fragmentos del marcador molecular utilizado.

²⁴ Según las observaciones hechas por Díaz 2003, frente a los perfiles genotípicos que poseen un solo producto o no poseen alguno.

²⁵ Los primeros resultados fueron discutidos por la Unidad de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical de Bélgica, desarrolladores de la técnica base, los cuales aceptaron como buenos (Comunicación personal con Rigouts, 25 de Mayo del 2007).

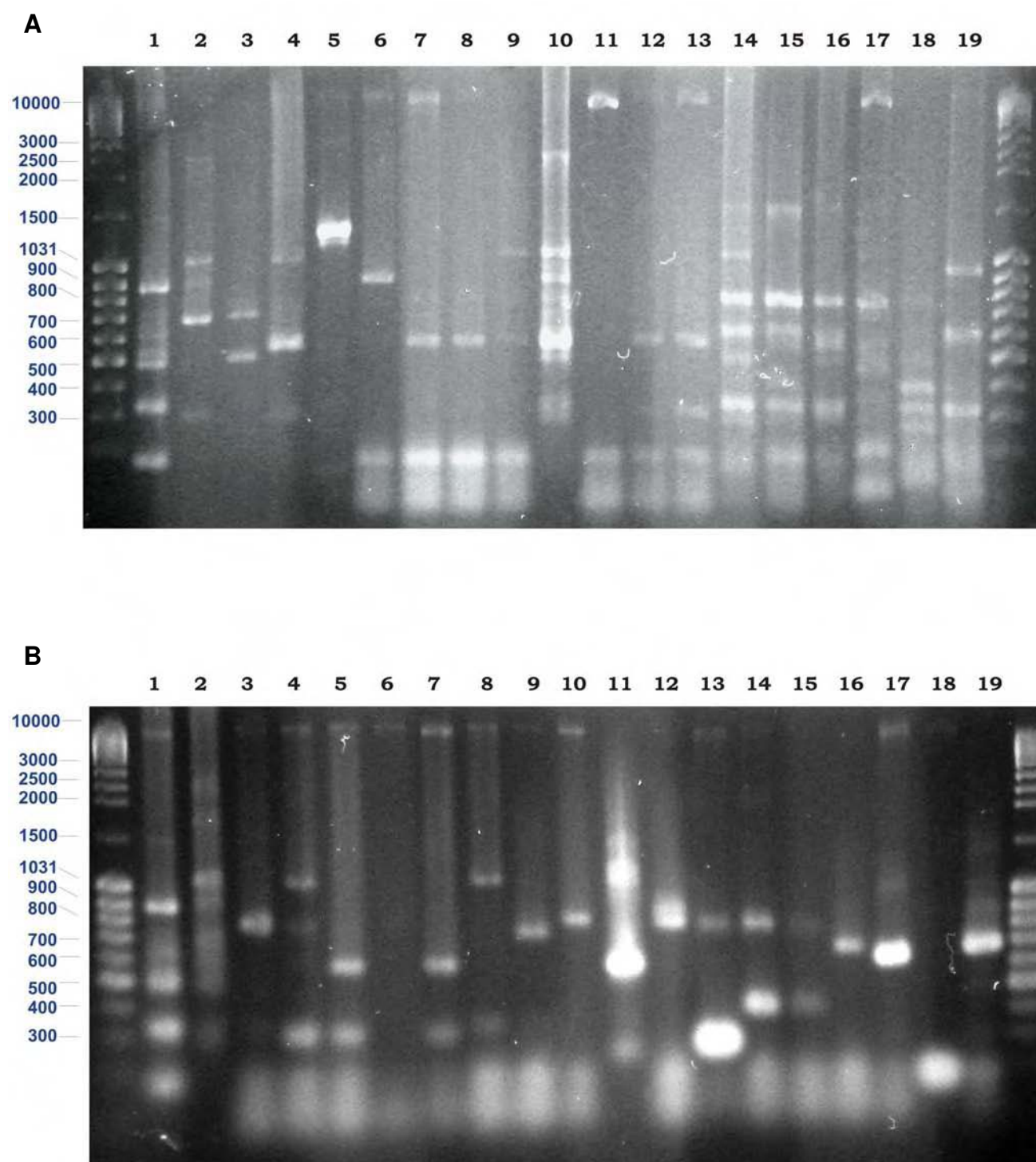


Figura 8. Patrón genotípico basado en PCR. Electroforesis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR. **A.** Línea 1, H37Rv; línea 2, cepa MDR (cepario HNGAI); líneas 3-19, MT002-MT018. **B.** Línea 1, H37Rv; líneas 2-17, MT020-MT035; líneas 18 y 19, MT054 y MT055. Los números de la izquierda indican el tamaño de los fragmentos del marcador molecular utilizado.

5.2.3. Agrupamientos entre cepas resistentes y de los pacientes seropositivos para VIH

En general se observó la presencia de 14 agrupaciones con un índice de similaridad mínimo del 80%, encontrándose 4 agrupaciones con coeficiente de 0,80; 1 con 0,85; 1 con 0,90 y 8 con 1,00 (Figura 9).

Las cepas que presentaron resistencia hacia las drogas, en todas sus formas, están distribuidas en todo el dendograma de forma indiferenciada, agrupándose con cepas sensibles o con resistencias diferentes. Aunque cabe destacar que en algunas agrupaciones cuyo coeficiente es de 0,80 hay relaciones entre cepas sensibles y cepas MDR o MDR plus, caso que también ocurre en agrupaciones que poseen coeficiente de 1,00 en este último caso también existen relaciones cepa sensible-cepa resistente a estreptomicina, cepa resistente a una o dos drogas- cepa MDR, otros casos se detallaran más adelante. En referencia a la cepa atípica en estudio, una de ellas presentaba una relación con una cepa sensible con un índice de similitud del 85%, y otro una relación con una cepa MDR cuyo índice de similaridad era del 90%.

Bajo la noción de agrupamiento teniendo como mínimo coeficiente de similaridad el 80%, los ocho perfiles genotípicos de las cepas de los pacientes seropositivos para VIH se hallaron en su mayoría agrupadas, existiendo solo un caso que no fue agrupado el cual fue de un paciente (MT042) cuya cepa era sensible y procedía del Hospital Grau. Dos agrupaciones relacionaban cepas de pacientes seropositivos para VIH y 3 relacionaban pacientes seropositivos con pacientes seronegativos para VIH.

5.2.4. Agrupamientos más importantes

Cluster I.- Conformado por 2 varones de 42 y 35 años de edad, uno (MT023) vivía en Lima y el otro vivía en el Callao (MT025²⁶), el primero es un caso de asociación VIH/TB con una cepa MDR, el segundo es un paciente con antecedente de tratamiento para TB, pero cuya cepa en el estudio de susceptibilidad para antibióticos, era sensible a estos.

Cluster II.- Esta conformada por 2 varones con cepas MDR, MT014 era un paciente geriátrico de 75 años de edad el cual lleva tratamiento de esquema 2 para MDR. MT015 tiene 31 años y

²⁶ Las nominaciones MT dadas en la presente investigación son referidas a los pacientes, los cuales poseen un caso individual el cual se describe en este conjunto de resultados.

fue hospitalizado en el Hospital Almenara por complicación en la enfermedad y fracaso de tratamiento.

Cluster III.- Contiene cepas de dos mujeres con 31 y 62 años, MT038 es un caso de recaída sumado a un fracaso en el tratamiento, ella vive en el Callao, su cepa es resistente a INH y SM. La paciente MT053 es un caso de un MDR que vive en Lima.

Cluster IV.- Es compuesto por dos varones con 27 y 51 años ambos con serotipo positivo para VIH, ambos son casos de asociación VIH con una cepa de *M. tuberculosis*. MT002 posee una cepa sensible, pero MT040 posee una cepa de *M. tuberculosis* MDR. Ambos pacientes residen en Lima.

Cluster V.- Esta conformada por un varón de 32 años y una mujer de 36 años, el varón (MT044) es un caso de asociación de VIH con una cepa de *M. tuberculosis* resistente a SM, el paciente vive en Lima y ha abandonado el tratamiento para la tuberculosis, la mujer (MT043) es un caso de recaída cuya cepa es sensible a todos los antibióticos, pero en que la paciente también abandona el tratamiento, este vive en el Callao.

Cluster VI.- Formado por dos varones de 32 y 30 años de edad, ambos son casos de asociación VIH-TB y ambos viven en Lima, ellos reciben tratamiento para VIH en el hospital Almenara, el cual posiblemente sea el lugar de contagio, el caso MT048 tiene una cepa resistente a INH, SM y TIO, el otro caso (MT054) es sensible a todos los antibióticos.

Cluster VII.- contiene dos mujeres de 28 y 38 años de edad, una de ellas MT049 tiene una cepa MDR plus y vive en Lima, la otra MT050 tiene una cepa resistente a SM y vive en el Callao.

Cluster VIII.- Comprende 3 varones de 44, 34 y 28 años, dos de ellos hermanos MT033 y MT041 y tienen cepas sensibles a todas las drogas, ambos declaran residir en dos domicilios: uno en Chosica (Lima) y el otro en San Luís (Lima), ellos tienen un hermano que tiene tuberculosis pero que no es estudiado en este trabajo, el otro paciente MT032 tiene también una cepa sensible a todas las drogas estudiadas, este paciente vive en La Victoria (Lima), su nexo puede ser el lugar cercano de residencia La Victoria, dado que los pacientes que son hermanos poseen una residencia en San Luís muy cercano a la Victoria.

5.2.5. Análisis Discriminante de las agrupaciones

En el análisis discriminante se estudian las técnicas de clasificación de sujetos en grupos ya definidos. En nuestro caso se observara si la clasificación es adecuada al tipo de agrupación que se ha realizado.

Prueba de lambda de Wilks

En la Tabla 8 podemos observar que los resultados de la prueba de lambda de Wilks se encuentran próximos al valor uno lo que nos indicaría que ninguna de las variables en este estudio contribuye significativamente en la diferenciación de los grupos de contagio u/o infección directa o indirecta de TB entre los pacientes.

Tabla 8. Resultados de la Prueba de lambda de Wilks. En esta tabla se observan que las variables poseen resultados de lambda de Wilks próximos al valor 1.

	Lambda de Wilks	F	gl1	gl2	Sig.
Sexo	,953	2,330	1	47	,134
Edad	1,000	,002	1	47	,964
Lugar de Residencia	,996	,171	1	47	,681
paciente con HIV	,962	1,842	1	47	,181
Enfermo de TBC anteriormente	,995	,237	1	47	,629
Sensible a las drogas estudiadas	,999	,068	1	47	,795
resistente a un solo antibiótico	1,000	,016	1	47	,901
resistente a dos antibiótico	,995	,229	1	47	,635
resistente a tres solo antibiótico	,995	,229	1	47	,635
multidrogo resistente	,970	1,465	1	47	,232
multidrogo resistente asociada a resistencia a drogas de segunda línea.	,990	,493	1	47	,486
Resistencia Primaria	,990	,493	1	47	,486
Resistencia Secundaria	,989	,509	1	47	,479

Prueba de validación cruzada

En la Tabla 9, se aprecia que el porcentaje de la clasificación de los casos agrupados es relativamente bajo, dado que solo el 40,8% de los casos son agrupados por validación cruzada.

Tabla 9. Clasificación de la agrupación. Resultados de la validación cruzada.

		Contagio u/o infección directa o indirecta de TB entre pacientes	Grupo de pertenencia		Total
			pronosticado		
			Contagio de TB	No contagio	
Original	Recuento	Contagio de TB	18	8	26
		No contagio	7	16	23
	%	Contagio de TB	69,2	30,8	100,0
		No contagio	30,4	69,6	100,0
Validación cruzada	Recuento	Contagio de TB	9	17	26
		No contagio	12	11	23
	%	Contagio de TB	34,6	65,4	100,0
		No contagio	52,2	47,8	100,0

5.2.6. Estimación del riesgo de contagio de la población en estudio

Bajo el criterio de agrupación de los perfiles genotípicos, y teniendo en cuenta de que estos podrían indicar una posibilidad de contagio entre los pacientes (van Soolingen *et. al.*, 1999), se realizó un estudio mediante el uso de *odds ratio* para todos los datos clínicos implicados con importancia epidemiológica obtenidos en el presente estudio, la cual se ve resumida en la Tabla 10. Además como comprobación y complemento del estudio anterior, se realizó también un estudio de Riesgo Relativo a cada uno de los parámetros antes señalados.

5.2.6.1 Estudio de *Odds Ratio* en la población

Se realizó un estudio de riesgo de transmisión de la enfermedad mediante el uso del Odds ratio, el cual se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 10. Estudio del *Odds Ratio*. Los intervalos de confianza del *Odds Ratio* al incluir el número 1, indicarían que las categorías no se verían influenciadas de una u otra forma en el contagio.

<i>Odds Ratio</i>		Contagio u/o infección directa o indirecta de TB entre los pacientes							Interpretación
Variables	Categorías	contagio de TB	%	no contagio	%	P_valor	<i>Odds ratio</i>	CI (95%)	
Sexo	Masculino	18	0,69	11	0,48	0,128	2,455	0,764 – 7,88	Es mas probable que los hombres contraigan la enfermedad que las mujeres
	Femenino	8	0,31	12	0,52				
		26		23					
Edad	<= a 30	8	0,31	5	0,22	0,475	1,600	0,439 – 5,838	Es mas probable que los menores de 30 contraigan la enfermedad
	> a 30	18	0,69	18	0,78				
		26		23					
Lugar de procedencia	Lima	19	0,73	18	0,78	0,674	0,754	0,202 – 2,812	Es igualmente probable que los que residen en Lima contraigan la enfermedad como los que residen en el Callao
	Callao	7	0,27	5	0,22				
		26		23					
Paciente presenta HIV	Si	6	0,23	2	0,09	0,174	3,150	0,568 – 17,477	Es tres veces más probable que los pacientes que tienen HIV se contagien con TBC
	No	20	0,77	21	0,91				
		26		23					
Enfermo de TBC anteriormente	Si	14	0,54	14	0,61	0,620	0,750	0,240 – 2,341	Es igual de probable que los que tuvieron anteriormente la enfermedad o no la vuelvan a contraer
	No	12	0,46	9	0,39				
		26		23					
Grado de resistencia a la cepa de tuberculosis	Sensible	10	0,38	8	0,35	0,790	1,172	0,365 – 3,762	Es mas probable que un paciente que es resistente al menos aun medicamento presente contagio directo por TBC
	Resistente a 1 antibiótico	2	0,08	2	0,09	0,898	0,875	0,113 – 6,767	
	Resistente a 2 antibiótico	2	0,08	1	0,04	0,626	1,833	0,155 – 21,65	
	Resistente a 3 antibiótico	2	0,08	1	0,04	0,626	1,833	0,155 – 21,65	
	Multidrogo resistente	6	0,23	9	0,39	0,224	0,467	0,135 – 1,610	
	Multidrogo resistente plus	4	0,15	2	0,09	0,476	1,909	0,316 – 11,54	
		26		23		0,852			
Tipo de resistencia de la cepa de tuberculosis	Sensible	10	0,38	8	0,35	0,790	1,172	0,365 – 3,762	Existe la presencia de riesgo de contagio en los pacientes que presentan resistencia primaria y secundaria.
	Resistencia Inicial	4	0,15	2	0,09	0,476	1,909	0,316 – 11,54	
	Resistencia Adquirida	12	0,46	13	0,58	0,469	0,659	0,213-2,039	
		26		23		0,688			

5.2.6.2. Estudio del Riesgo Relativo en la población

En todos los casos la interpretación de los resultados de los riesgos es igual al del estudio de *Odds Ratio*.

El riesgo de contagio entre los hombres es mayor que el de las mujeres, así como los menores de 30 años poseen mayor probabilidad de contagio que los mayores de 30 años (Tabla 11). Además existe una igualdad de riesgo de contagio con TB con respecto a los que residen en Lima o Callao (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de Riesgo en la variable sexo, edad y residencia. Los hombres tienen dos veces más riesgo de adquirir TBC que las mujeres, los menores de 30 tienen dos veces más probabilidad de adquirir TB, y el riesgo que contraer la enfermedad es igual para los que residen en Lima y Callao.

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para Sexo (Masculino / Femenino)	2,455	0,764	7,888
Razón de las ventajas para edad recodificada (\leq a 30 / $>$ a 30)	1,600	0,439	5,838
Razón de las ventajas para Lugar de Residencia (Lima / Callao)	0,754	0,202	2,812

Los pacientes infectados con VIH, poseen un alto riesgo de contagio con TB (Tabla 12), caso contrario con los pacientes que presentan antecedentes de enfermedad con tuberculosis (Tabla 12).

Tabla 12. El análisis de Riesgo de contagio en pacientes con VIH y en pacientes con antecedentes de tratamiento. Es tres veces más riesgoso que los pacientes que tienen VIH se contagien con TB. El riesgo de contraer la enfermedad es igual para los enfermos que anteriormente tuvieron o no la enfermedad.

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para paciente con HIV (Si / No)	3,150	0,568	17,477
Razón de las ventajas para Enfermo de TBC anteriormente (Si / No)	0,750	0,240	2,341

En los casos de los pacientes que tuvieron cepas sensibles a los antibióticos presentan igualdad de riesgo de contagio con TB (Tabla 13), al igual a los que son resistentes a un antibiótico y MDR. Los casos de resistencias a 2 drogas, 3 drogas y XDR (Tabla 13 y 14), poseen mayor riesgo de contagio con TB.

Tabla 13. El Riesgo en la variable resistencia. El riesgo de contraer la enfermedad es igual para los pacientes que son o no sensibles a las drogas, y para los pacientes que son o no resistentes a una droga. El paciente que es resistente a dos o tres drogas tiene dos veces más riesgo de contraer la enfermedad.

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para pacientes con cepas sensibles a los antibióticos (Si / No)	1,172	0,365	3,762
Razón de las ventajas para pacientes con cepas resistentes a un solo antibiótico (Si / No)	0,875	0,113	6,767
Razón de las ventajas para pacientes con cepas resistentes a dos antibióticos (Si / No)	1,833	,155	21,657
Razón de las ventajas para pacientes con cepas resistentes a tres antibiótico (Si / No)	1,833	0,155	21,657

Tabla 14. Tabla de Riesgo en la variable Paciente es multidrogo resistente o es extradrogo resistente. El riesgo de contraer la enfermedad es igual para los pacientes que son o no multidrogo resistente. El paciente que es extradrogo resistente tiene dos veces más riesgo de contraer la enfermedad.

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para multidrogo resistente (Si / No)	0,467	0,135	1,610
Razón de las ventajas para multidrogo resistente asociada a resistencia a drogas de segunda línea (Si / No)	1,909	0,316	11,545

Los casos de pacientes con resistencia inicial, poseen mayor riesgo de contagio que los casos que presentan resistencia secundaria (Tabla 15).

Tabla 15. Tabla de Riesgo en la variable Paciente con resistencia inicial o con resistencia adquirida. El paciente que posee resistencia primaria tiene 2 veces más riesgo de contraer la enfermedad. El riesgo de contraer la enfermedad es igual para los pacientes que tienen o no resistencia secundaria.

	Valor	Intervalo de Confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para Resistencia Inicial (Si / No)	1,909	0,316	11,545
Razón de las ventajas para Resistencia Adquirida (Si / No)	0,659	0,213	2,039

5.2.7. Datos de las vías de contagio

En la mayoría de los casos no existe información acerca de cómo los pacientes se contagiaron con *M. tuberculosis*. Siendo una excepción los casos de los pacientes MT012, MT018 y MT049, correspondientes a trabajadores de salud (TS), los cuales adquirieron la enfermedad durante su labor en el hospital donde trabajan. Cabe indicar que, MT018 era el único caso que presentaba algún tipo de resistencia a las drogas antituberculosas, los demás eran sensibles. Solo MT012 fue agrupado con MT006 (0,85 de coeficiente de similaridad), que corresponde a una cepa de *Mycobacterium* no tuberculosis (atípica).

Una excepción es el caso MT054, la paciente es una niña (15 años de edad) que fue hospitalizada por neumonía en el hospital Almenara, cuyo perfil genotípico posee muy poca similitud con las otras cepas del dendrograma estudiadas en esta investigación.

Otra excepción es el caso MT041, cuya cepa muestra igual perfil genotípico que el hallado en la cepa procedente de su hermano mayor MT033 como se demuestra en el *cluster* IX.

Tabla 16. Distribución de las cepas en estudio siguiendo el patrón obtenido por el genotipaje. Se detallan los datos del número de productos amplificados, el lugar de los centros asistenciales de origen de los pacientes, así como los detalles de sus resistencias. Se agregaron otras notas que pudieran ser de interés. Los asteriscos señalan las cepas de *Mycobacterium* MDR plus que fueron consideradas microbiológicamente atípicas, al presentar características diferentes a una cepa normal, se detallara adelante más datos acerca de esto.

Código de cepa	Número de bandas	Centro Asistencial	Resistencia	Resistencia Detallada	Otros Datos
MT007	2	Hospital Sabogal	S	S	
MT011	3	Hospital Carlos Alcántara	S	S	
MT006	2	Hospital Sabogal	MDR plus*	INH SM RIF EMB PAS TIO KN	
MT012	4	Policlínico Chíncha	S	S	T. SALUD
MT005	3	Policlínico Castilla	S	S	
MT010	2	Policlínico San Luis	MDR plus	INH SM RIF EMB TIO KN	
MT003	2	Hospital Grau	S	S	VIH+
MT008	3	Policlínico Pizarro	MDR	INH SM RIF PAS PZA	VIH+
MT029	4	Hospital Voto Bernales	MDR plus	INH RIF KAN PZA	
MT026	3	Hospital Sabogal	1 D	SM	
MT035	3	Hospital Sabogal	S	S	
MT024	1	Policlínico Mongrut	MDR	INH SM RIF EMB PZA	
MT028	2	Hospital Grau	MDR	INH SM RIF	
MT023	3	Policlínico Pizarro	MDR	INH RIF EMB TIO PZA	VIH+
MT025	3	Hospital Sabogal	S	S	
MT022	3	Hospital Almenara	MDR	INH SM RIF EMB	ABANDONO
MT013	7	Hospital Vitarte	MDR	INH SM RIF	
MT016	6	Policlínico Molina	MDR plus *	INH SM RIF EMB PAS TIO KN PZA	
MT014	5	Hospital Sabogal	MDR	INH RIF	
MT015	5	Policlínico Díaz Ufano	MDR	INH SM RIF EMB TIO PZA	
MT038	3	Hospital Sabogal	2 D	S	
MT053	3	Hospital Grau	MDR	INH SM RIF EMB TIO PZA	
MT002	2	Hospital Sabogal	1 D	SM	
MT040	2	Policlínico Pizarro	MDR	INH SM RIF	VIH+
MT009	7	Policlínico Paramonga	S	S	
MT043	2	Policlínico Negreiros	S	S	

MT044	2	Policlínico Díaz Ufano	1D	SM	VIH+, ABANDONO
MT051	6	Hospital Almenara	2D	SM RIF	
MT055	2	Policlínico Díaz Ufano	MDR plus	INH SM RIF EMB TIO KN PZA	
MT018	3	Hospital Sabogal	2D	EMB TIO	T. SALUD
MT048	6	Hospital Almenara	3D	INH SM TIO	VIH+
MT054	6	Policlínico Próceres	S	S	VIH+
MT047	4	Hospital Almenara	MDR	INH RIF EMB	
MT049	5	Hospital Sabogal	SM	SM	
MT050	5	Hospital Vitarte	MDR plus	INH SM RIF EMB PAS TIO KN PZA	
MT017	2	Hospital Voto Bernales	3D	SM RIF TIO	
MT042	3	Hospital Grau	S	S	VIH+
MT020	7	Hospital Sabogal	S	S	
MT027	2	Hospital Sabogal	1D	SM	
MT052	1	Policlínico Castilla	MDR	INH SM RIF EMB	PEDIATRIA
MT030	2	Policlínico Chíncha	MDR	INH SM RIF EMB	ABANDONO
MT039	1	al Grau	S	S	T. SALUD
MT000	6		S	S	H37Rv
MT032	2	Hospital Grau	S	S	
MT033	2	Hospital Voto Bernales	S	S	
MT041	2	Policlínico Chosica	S	S	
MT021	1	Policlínico Chosica	MDR	INH SM RIF EMB TIO PZA	
MT031	2	Policlínico Pizarro	S	S	
MT034	1	Policlínico Castilla	MDR	INH RIF PZA	
MT004	1	Hospital Almenara	S	S	PEDIATRIA

5.3. Estudio bioinformático

Utilizando los programas informáticos anteriormente citados, se obtuvo una explicación detallada, exacta y gráfica de los fundamentos de la técnica usada en esta investigación, lo cual se muestra a continuación:

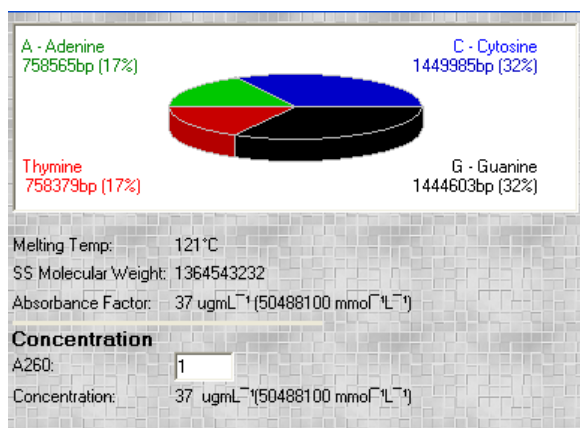


Figura 3. Información del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv según el software Genamics expresión 1.1.

Como se observa en la figura 3, el Genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv posee un tamaño de 4411532 pb, con un peso molecular de cadena simple (SS molecular weight) de 1364543232, además posee una temperatura de desnaturalización del ADN de 121°C.

De igual forma se puede apreciar que los porcentajes de las bases nucleotídicas son las siguientes: Adenina (17%), timina (17%), citosina (32%), guanina (32%).

Se determinó que la secuencia IS6110 posee un tamaño de 1355 pb, se repite 16 veces en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, posee 32 ORF y se halla en las siguientes posiciones dentro del genoma (en pb): 1996121, 2365434, 2550034, 2635597, 2972129, 3551250, 3552733, 3710402, 3890799, 1541972, 1987723, 2430137, 2784635, 3120544, 3795078.

Se observó que dentro del genoma la distancia mínima entre las secuencias de inserción es de 1483 pb y la máxima de 3890799 pb, siendo el promedio de todas las distancias de 665697,375 pb.

En relación a los primers IS1 (5'-CGGACTCACCGGGGCGGTTCA-3') e IS2 (5'-CGGACATGCCGGGGCGGTTCA-3'), estos se sitúan de forma inversa en los flancos de la secuencia de inserción IS6110, como lo muestra la siguiente figura:

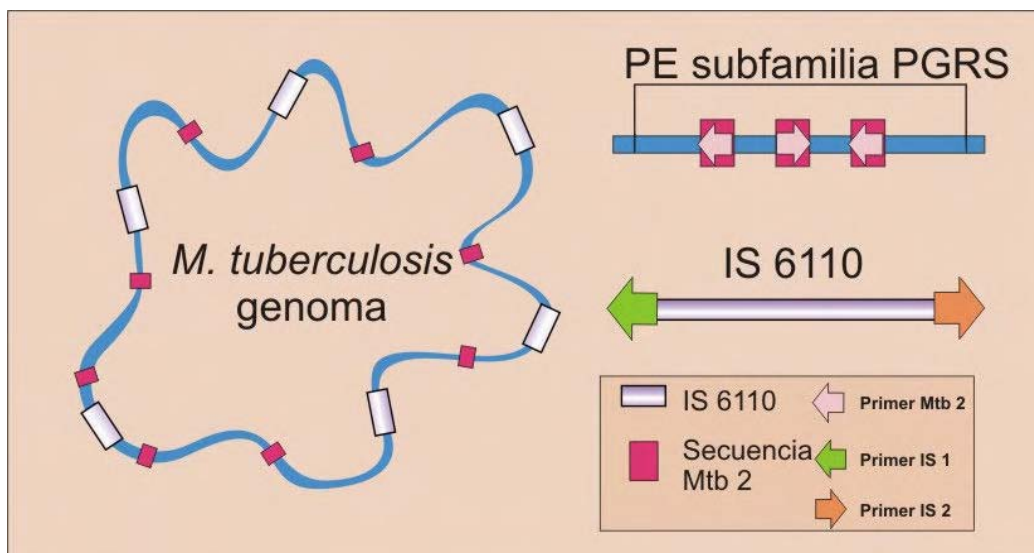


Figura 4. Genoma hipotético de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en el que se esquematizan las posiciones de la secuencia de inserción IS6110, de la familia de genes PE subfamilia PGRS, de la secuencia Mtb2 y de los primers en el estudio.

Según lo observado la hibridización de los primers a lo largo del genoma es según la posición en que se encuentra la secuencia de inserción, el cual su orden de secuencia cambia de un sentido horario en el genoma a un sentido antihorario, por lo que algunas veces se observan a los primers intercalándose entre posiciones iniciales y finales (ver Anexo 2)

En el caso del primer IS1 se observó que el número de hibridizaciones en sentido horario es de 10 y en sentido antihorario es de 6; en el caso del IS2 el número de hibridizaciones en sentido horario es de 6 y en sentido antihorario es de 10, lo cual lógicamente es correcto.

En el caso del primer MTB2 (5'-CGGCGGCAACGGCGGC-3'), esta se localizó en su mayoría, dentro de las secuencias de la familia de genes PE subfamilia PGRS, cuya función es desconocida (Delogu *et. al.*, 2004), pero se le relaciona con la función de inmunopatogenicidad de las regiones de agrupación genética ESAT-6 (esax).

En el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv estudiado la secuencia Mtb2 se halla repetido 152 veces, los cuales se muestran en el anexo 2. Siendo la distancia mínima entre ellos de 9 pb y la máxima de 573806 pb, siendo el promedio de las distancias de 2903,24 pb.

Se observó que se hibridiza 62 veces en sentido horario y 88 veces en sentido antihorario, según la posición de la secuencia génica en la cual se encuentra (si esta en sentido horario o antihorario).

Los productos de la amplificación de los 3 primers (IS1, IS2 y MTB2), dependen de los alineamientos de los primers en los sitios blanco, los cuales pueden ser: i) Un primer IS1 o IS2 con el primer MTB2, ii) un primer MTB2 con otro MTB2, iii) un primer IS1 con un primer IS2 (Figura 10).

5.3.1. Estudio Genómico comparativo de las cepas de *M. tuberculosis*

Como complemento al estudio realizado, se elaboró un modelo *in silico*²⁷ del proceso de genotipificación basado en PCR utilizando las herramientas bioinformáticas Genamics Expresión 1.1., Lasergene 7.2 (DNASTAR), y Artemis Release 9 (Sanger Institute). Asimismo usamos la secuencia y la base de datos del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* publicado por el Instituto Sanger.

Se halló que el número estándar de productos de la amplificación por PCR para la cepa H37Rv es de 11 (Figura 10 D) con pesos desde 170 pb hasta 7043 pb. Los resultados observados del PCR con la cepa de referencia (H37Rv Instituto Pasteur), se observó que esta solo tenía 6 productos de amplificación, siendo una de ellas inespecífica para el resultado teórico (Figura 8 y Figura 10 E, segunda columna).

Los seis productos de los primers en el caso de la cepa de referencia se observan, como lo muestran las flechas rojas, en la Figura 10 D (H37Rv (A) (modelo *in silico* de los perfiles genotípicos de la cepa H37Rv) y en la segunda columna de la figura 10 E que muestra los perfiles genotípicos de la cepa H37Rv, poseen pesos aproximados de

²⁷ Hecho en computadora o vía simulación computacional.

(siguiendo un orden vertical descendente de la figura de representación gráfica): 7043 pb, 1497 pb, 862 pb, 500 pb, 300 pb*, 170 pb, siendo la secuencia inespecífica la que muestra un asterisco.

Los perfiles genotípicos generados por la cepa H37Rv utilizada en el estudio (Figura 10 D H37Rv (A) y Figura 10E) coincidían dentro de los patrones establecidos en el modelo (Figura 10 D H37Rv), a excepción de las secuencias faltantes y la secuencia denominada inespecífica.

Se determinó que los seis productos faltantes de la cepa H37Rv de referencia, tenían pesos de 2631 pb, 2439 pb, 2146 pb, 2164 pb, 1635 pb y 1305 pb. Se reparó que posiblemente la ausencia de estos productos era consecuencia de la pérdida de los sitios de hibridización en los siguientes casos (siguiendo un orden de izquierda a derecha de los modelos): De la primera y la cuarta secuencia Mtb2 en el caso del modelo A, y de la segunda y tercera secuencia Mtb2 en el caso del modelo B, tal y como se señalan con asteriscos.

Para la determinación del origen de la secuencia inespecífica se realizó un PCR utilizando solamente los primers IS1 e IS2 para el proceso de hibridización del cual se determinó que la secuencia de 300 pb es producto de dos secuencias IS6110 cercanas entre sí. También por este proceso se comprobó que las secuencias de 170 pb y 7043 pb son producto de los primers IS1 e IS2²⁸.

En resumen, se halló que la cepa de referencia presentaba pérdidas de secuencias Mtb2 y de una transposición de una secuencia IS6110 para dar como producto una secuencia inespecífica.

Al observar estas diferencias, se decidió realizar modelos *in silico*, como los antes descritos, con las secuencias de *Mycobacterium tuberculosis* relacionadas con las resistencias MDR y XDR, utilizando el software Genamics Expresión 1.1. a fin de tener un **patrón comparativo** para lo observado en el presente estudio.

²⁸ Cabe acotar que en la fotografía mostrada en la figura 10 F se observa la presencia de otras secuencias las cuales fueron detectadas y separadas al no ser encontradas dentro del proceso estandarizado de genotipificación basado en PCR.

Los esquemas muestran los modelos *in silico* del proceso de genotipaje para los genomas **KZN 605**, **KZN 1435** y **KZN 4207** cuyas secuencias pertenecen a los genomas de cepas de *M. tuberculosis* XDR, MDR y sensible a las drogas respectivamente, aisladas de pacientes de Kwazulu-Natal, Sudáfrica. Estas secuencias fueron publicadas por el Instituto Broad, los cuales se encuentran disponibles en la página web del instituto (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/mycobacterium_tuberculosis_spp/KZNDownloads.html) y en el NCBI²⁹.

Los productos de los primers utilizados en el estudio en referencia muestran que el genoma de la cepa KZN 605, tienen pesos desde 485 pb a 3152 pb; para KZN 1435 de 861 pb a 1501pb y para KZN 4207 de 861 pb a 1727 pb, con presencia de 3 o 5 amplificados.

Como se observa en la representación del PCR todos los perfiles para los KZN son diferentes entre si y diferentes con los resultados de los H37Rv, pero tienen un producto de amplificación en común, el cual es la secuencia que posee un peso de 862 pb o 840 pb como es en el caso del KZN 605 (Figura 11), todos estos proceden de un origen común, el cual es que todos son productos de un primer IS2 con otro primer Mtb2, el cual coincidentemente en todos los casos es seguido de 2 secuencias Mtb2 cercanas entre 2000 y 500 pb y todos crean productos de amplificación con la secuencia IS2 antes mencionada (Figura 11 modelos A, C y D).

Otra particularidad de la figura 11 es el posible movimiento de las secuencias de inserción y la desaparición de secuencias Mtb2, como lo demuestran las apariciones y desapariciones de los productos de amplificación relacionados con ellos.

Sumado a todo esto, se aplicó una simulación de agrupamiento usando el programa informático MVSP, el cual bajo el coeficiente de Pearson determinó la agrupación de los perfiles genotípicos, teniendo como variable la ausencia o presencia de los productos, obteniéndose los resultados siguientes:

²⁹ Según el Instituto Broad los genomas KZN 4207 y KZN 605 aún faltan terminar de secuenciar algunas porciones del genoma, aunque como lo declaran los autores, estos genomas prácticamente están completados. El genoma de KZN 1435 está completo.

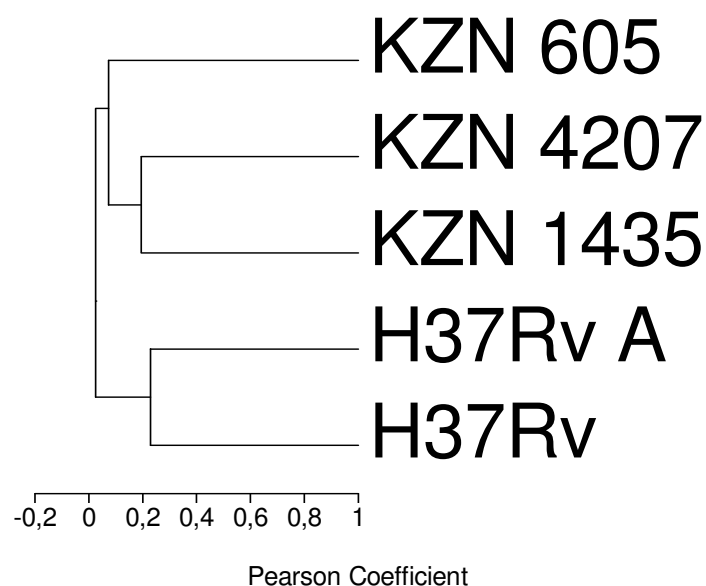


Figura 12. Dendrograma obtenido por el programa MVSP para los perfiles genotípicos de las cepas H37Rv y KZN.

Tomando a los resultados de la cepa H37Rv (Sanger Institute) como patrón, este pequeño dendrograma (Figura 12) muestra que existe una similitud significativamente pequeña (0,025) entre las cepas H37Rv y las cepas KZN.

Se observan dos agrupaciones separadas: i) Los H37Rv los cuales poseen un índice de similitud de 0,228 y ii) Los KZN, teniendo una mayor similitud entre los perfiles genotípicos de KZN 4207 y KZN 1435 (0,194), pero poseyendo ambos una menor similitud con KZN 605 (0,072) del que cabe resaltar que esta última es la cepa XDR.

5.3.1. Estudio genómico comparativo de las cepas de *M. tuberculosis*

Para darle mayor validez a la metodología utilizada y a los resultados anteriormente obtenidos, se realiza un estudio comparativo de sus genomas. Usando el programa Mauve 2.0 se compararon los genomas de: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* KZN 4207, *M. tuberculosis* KZN 1435 (MDR), *M. tuberculosis* KZN 605 (XDR). Obteniendo lo siguiente:

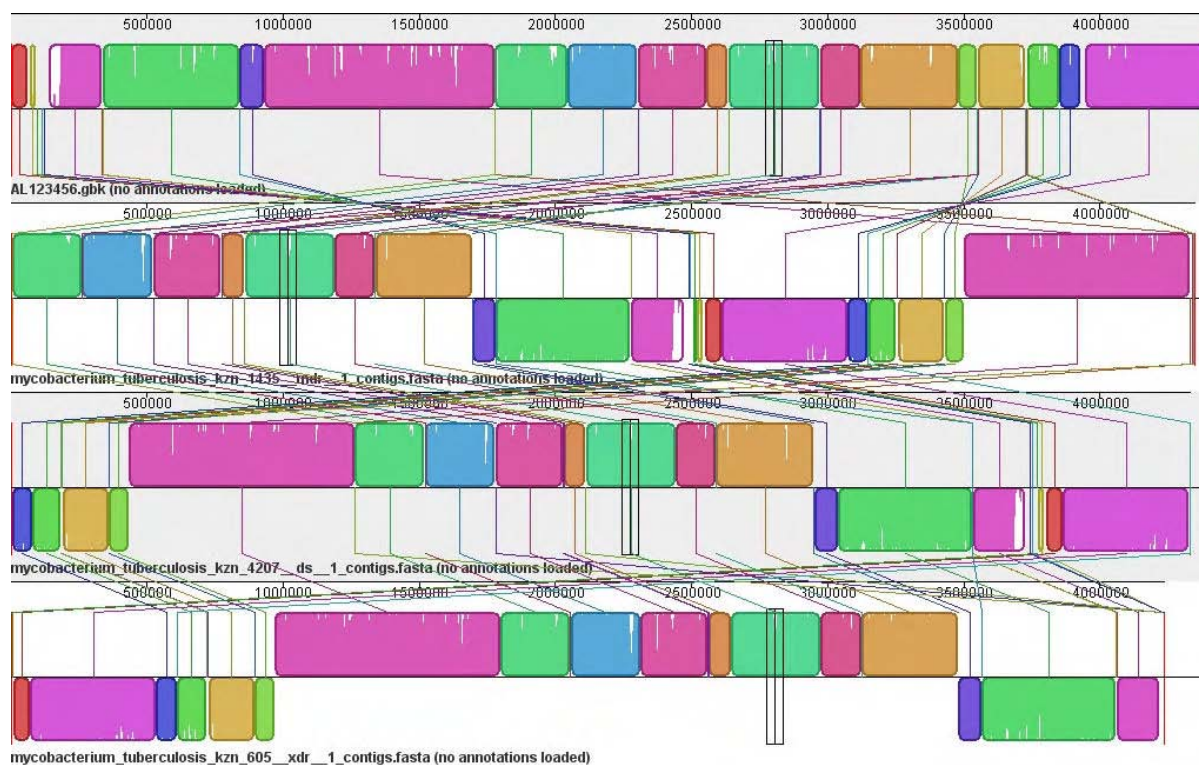


Figura 13. Los bloques señalan las regiones conservadas en los genomas, los espacios en blanco señalan la pérdida de estas en parte o en su totalidad. El orden de los genomas es el siguiente (en forma descendente): *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* KZN 4207, *M. tuberculosis* KZN 1435 (MDR), *M. tuberculosis* KZN 605 (XDR). Las regiones invertidas probablemente se deban a consecuencia de los diferentes procesos de secuenciación.

Existen 41 zonas de bloques colineales, los cuales indican un alto índice de conservación de regiones en los diferentes genomas. Aunque cabe resaltar que muchos de los bloques colineales no son totalmente similares entre sí, manifestándose en algunos casos diferencias en los tamaños, además existe la presencia de espacios dentro de los bloques, lo que manifiesta que en algunos sectores existen diferencias en las secuencias (Figura 13).

Cabe señalar que existe pérdida de similitud entre los genomas de las cepas KZN con respecto al genoma de la cepa H37Rv, siendo hallados dentro de las secuencias Rv, en las familias de genes PPE y PE, en las secuencias de inserción IS6110 y otros. Dos casos de los que resaltan son: primero el relacionado con la girasa B, en el cual se halla una pérdida de similitud de 1000 pb, este gen está relacionado con la resistencia a la fluoroquinolona, el cual es un fármaco de segunda línea y relacionado a la XDR (Pittaksajakul *et. al.*, 2005) y segundo el relacionado con el probable gen *ctpB*, el cual posee una pérdida de similitud de 300 pb y codifica una proteína transmembrana transportadora de cationes y con función ATPasa.

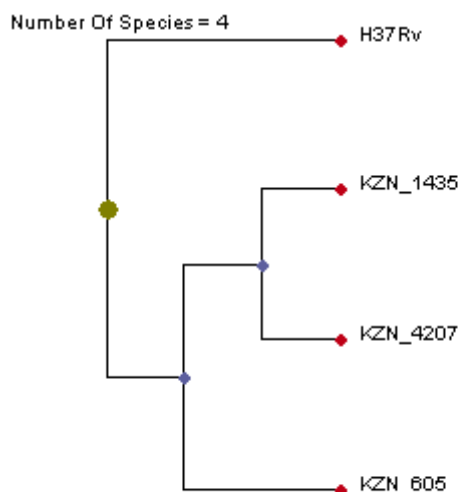


Figura 14. Dendrograma de los genomas obtenido por el programa Mauve 2.0.

El dendrograma obtenido³⁰ en este estudio (Figura 14) muestra las mismas similitudes que lo obtenido en el dendrograma anterior (Figura 12).

Tabla 17. Repeticiones de la secuencias de los primers utilizados en diferentes especies del Género *Mycobacterium*. Se muestran las cantidades de repeticiones de las secuencias de los primers dentro de diversos genomas del género *Mycobacterium*.

Genoma	Nº de repeticiones obtenidos con los primers		
	IS1	IS2	Mtb2
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	16	16	152
<i>M. Bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	1	1	153
<i>M. tuberculosis</i> CDC 1551	4	4	153
<i>M. tuberculosis</i> Haarleem	8	8	33
<i>M. tuberculosis</i> KZN 605	15	15	55
<i>M. tuberculosis</i> KZN 1435	14	14	52
<i>M. tuberculosis</i> KZN 4207	11	11	50
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	0	0	11
<i>M. Leprae</i> TN	0	0	0
<i>M. ulcerans</i> Agy 99	0	0	0

³⁰ Los resultados numéricos del dendrograma obtenido por el software Mauve 2.0.0 (Genome Evolution Laboratory) fueron graficados por el software Phylodraw 0.8 (Graphics Application Lab. Pusan National University)

6. Discusión

6. Discusión

6.1. Epidemiología de la tuberculosis en Lima

6.1.1. Sobre la población en estudio

La tuberculosis constituye uno de los principales problemas de Salud Pública en el Perú, siendo reportados en el año 2005 el número total de 35,541 casos de TB notificados³¹ y con una tasa de morbilidad de 129 x 100, 000 habitantes, siendo las zonas de mayor incidencia las de Lima y Callao, los cuales notifican el 58,7% de casos de todo el país (Perú, 2006).

En la presente investigación se halló que el 75% de la población enferma estaba dentro del rango de edad productiva, es decir entre los 15 a 55 años, dato que es confirmado por la nota pública de la WHO en referencia a la tuberculosis, en la cual señala que la tuberculosis afecta mayormente a personas dentro de la edad productiva en los países subdesarrollados (WHO, 2006), considerando que la población económicamente activa (PEA) en nuestro país refiere un estimado de 12, 000, 139 personas (INEI) los cuales se constituyen en una población expuesta a mayores riesgos de infección por su contacto con otros enfermos sea por motivos de trabajo, educación, transporte, diversión, etc.

Hubo una mayor población de pacientes con TB en Lima que en el Callao (Tabla 1), lo cual es un resultado similar a lo que se observa en otros estudios de distribución de esta enfermedad dentro de esta área (Perú, 2006)³². La razón por la cual sucede este hecho es debido a la alta densidad poblacional que existe en Lima, la cual posee 7, 605 700 de habitantes (INEI, 2007) en los que la bacteria se puede expandir mas fácilmente, a esto se añade la falta de salubridad y control de esta enfermedad en las zonas populosas, entre otras razones (WHO, 2006).

El mayor número de los pacientes presentó antecedentes de la enfermedad (Tabla 2), lo cual es lógico dado que la gran mayoría ellos fueron diagnosticados por fracaso al tratamiento o contacto con un paciente con tuberculosis MDR.

³¹ Se reporta además 30,226 casos nuevos

³² En estos estudios se muestra que existe una mayor tasa de incidencia en Lima que en el Callao. Se menciona además que Lima posee el distrito con la mayor incidencia de TB en el Perú (La Victoria).

Existe una población pequeña de personas que presentan asociación VIH/TB (Tabla 3), siendo esto relativamente común en todos los países que presentan este tipo de casos, en comparación con los casos de pacientes que solo presentan la enfermedad de la tuberculosis (WHO, 2006).

6.1.2. Sobre la transmisión de la tuberculosis en la población

Estadísticamente los niveles de transmisión de la tuberculosis dentro del estudio no están asociados con el sexo, la edad, lugar de residencia, infección por VIH, antecedente de infección por tuberculosis o tipo de resistencia, como lo demuestra la prueba lambda de Wilks y la validación cruzada. Similares ocurre también en algunos de los trabajos citados relacionados a estudios epidemiológicos moleculares en tuberculosis (van Soolingen *et. al.*, 1999; Foschiani *et. al.* 2002), este hecho puede ser por dos razones: i) Como lo menciona Foschiani *et. al.*, 2002, posiblemente es debido a la falta de datos o veracidad de estos o también ii) Al hecho de existir tantas clonas diferentes dentro de las investigaciones que no es difícil de especular que existan también medios de contagios distintos para algunas de ellas.

Independientemente, los niveles de riesgo según los estadísticos de *Odds ratio* y Riesgo Relativo, en general muestran lo siguiente:

I) Los varones poseen mayor riesgo de contagio que las mujeres además de que los menores de 30 años tienen mayor riesgo de contagio que los mayores de 30 años³³ (Tabla 10 y Tabla 11), estas observaciones se pueden sustentar y comparar con lo que sucede en la población general infectada con tuberculosis en el Perú, en los cuales los reportes de tuberculosis publicados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) para nuestro país, tal y como lo señala la figura 15, los varones poseen mayor cantidad de casos notificados de infección que las mujeres, añadido de que los picos de la curva en los casos de hombres y mujeres, se hallan entre las edades de 15 a 25 años. Finalmente cabe señalar que los datos mencionados por la WHO podrían complementarse con el presente estudio dado que estas tendencias de contagio, bajo

³³ Se señala que de ambas afirmaciones se puede deducir que existiría un mayor riesgo entre los varones menores de 30 años, afirmación que se sostiene en la información dada por la WHO y detallada en la figura 15.

estos parámetros, son repetidos en una población con la característica de ser diagnosticados todos con fracaso terapéutico y específicamente en personas que presentan infecciones con *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos, MDR y MDR plus.

Case notifications by age and sex

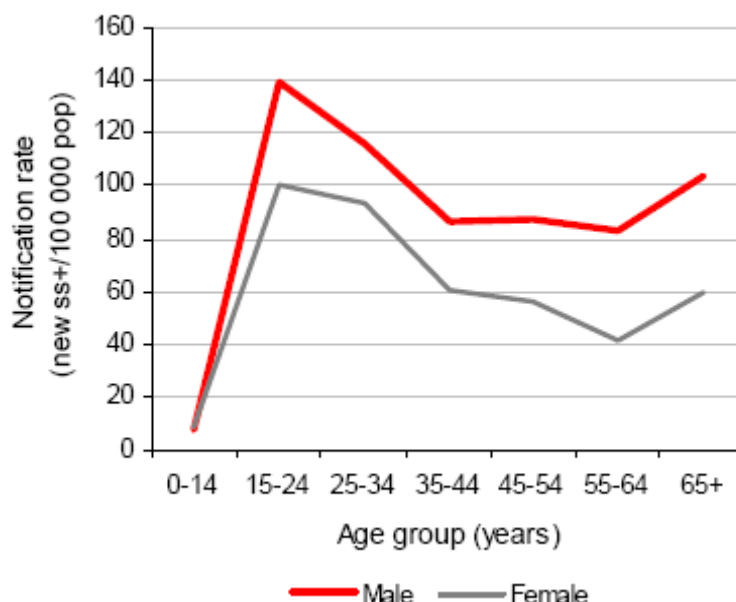


Figura 15. Numero de casos notificados por edad y sexo en el Perú (WHO, 2005)

II) El riesgo de contagio entre los habitantes de Lima y Callao es la misma (Tabla 10 y Tabla 11), este suceso puede interpretarse como que la población distribuida en ambas áreas geográficas interactúan en las infecciones por contagio directo, los cuales en forma conjunta generan una gran área geográfica de transmisión de la enfermedad. Este hecho es respaldado en varios casos dentro del estudio, en los que habitantes de Lima y Callao se hallan reunidos en una sola agrupación o en un solo *cluster*. Por otra parte, se debe mencionar que actualmente Lima y Callao se han convertido en un “Área Metropolitana” continua, con una población total de aproximadamente 8 millones y con un área administrativa de 2,794 kilómetros cuadrados, sobre este territorio los habitantes de la metrópoli efectúan diariamente alrededor de 10 387,669 viajes por vía terrestre (Agencia de Cooperación Internacional de Japón, 2005), siendo uno de los principales flujos la del transporte público que cubre la ruta de Lima – Callao por la vía de la Avenida La Colonial. El flujo diario de habitantes entre ambas provincias, por razones de trabajo, educación o domicilio, podría explicar este punto.

iii) Es tres veces más probable que los pacientes que tienen VIH se contagien con TBC (Tabla 10 y Tabla 12), muchos estudios han afirmado que la coinfección por VIH/TB y la resistencia a las drogas son factores de riesgo en el desarrollo de TB (Edlin et al., 1992; Coronado et al., 1993; Small et al., 1993; Ivens de Araújo et al., 1998), las personas infectadas con VIH o que padecen otros trastornos médicos que pueden debilitar el sistema inmunitario poseen mas riesgo de infectarse no solo de cepas de *M. tuberculosis* sensible a las drogas tuberculostáticas sino además de los tipos MDR y XDR (WHO, 2006).

El Ministerio de Salud del Perú (MINSA) notifica que la asociación VIH/TB en el año 2005 representa el 1,9% de la morbilidad por tuberculosis en general y una tasa de incidencia de coinfección de 2,42 x 100, 000 habitantes. Estudios anteriores hechos en el Perú referente a las coinfecciones VIH/TB (Perú, 2006) señalan que estos pacientes poseen una elevada morbilidad nosocomial (Campos *et. al.*, 2003), según los reportes del MINSA, esta concentración de pacientes que presentan este tipo de coinfección se agudiza a partir de mediados de 1990, coincidiendo con el fortalecimiento del programa de SIDA y VIH (PROCETSS), lo que concentro en los hospitales el manejo de la epidemia de VIH/SIDA, en los cuales no se tomaron las medidas preventivas en relación a la TB, lo que origino los brotes epidémicos de origen nosocomial de VIH/TB incluyendo casos de VIH/TB MDR. Se estima que el 80% de los casos VIH/TB MDR ocurren en Lima y Callao. En base a estos datos se puede afirmar que el riesgo mencionado anteriormente debe estar mayormente relacionado a la morbilidad intrahospitalaria de TB de los pacientes con VIH, los cuales se señalan en algunos resultados como son los casos del *cluster* IV y VI.

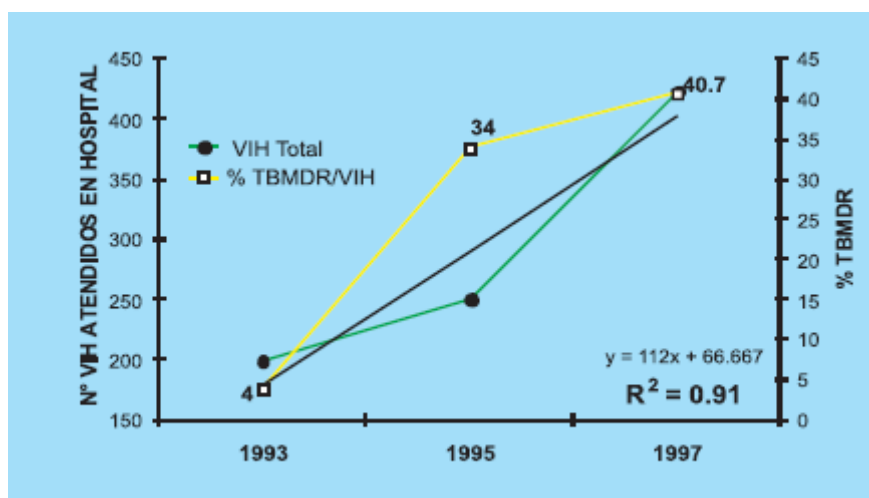
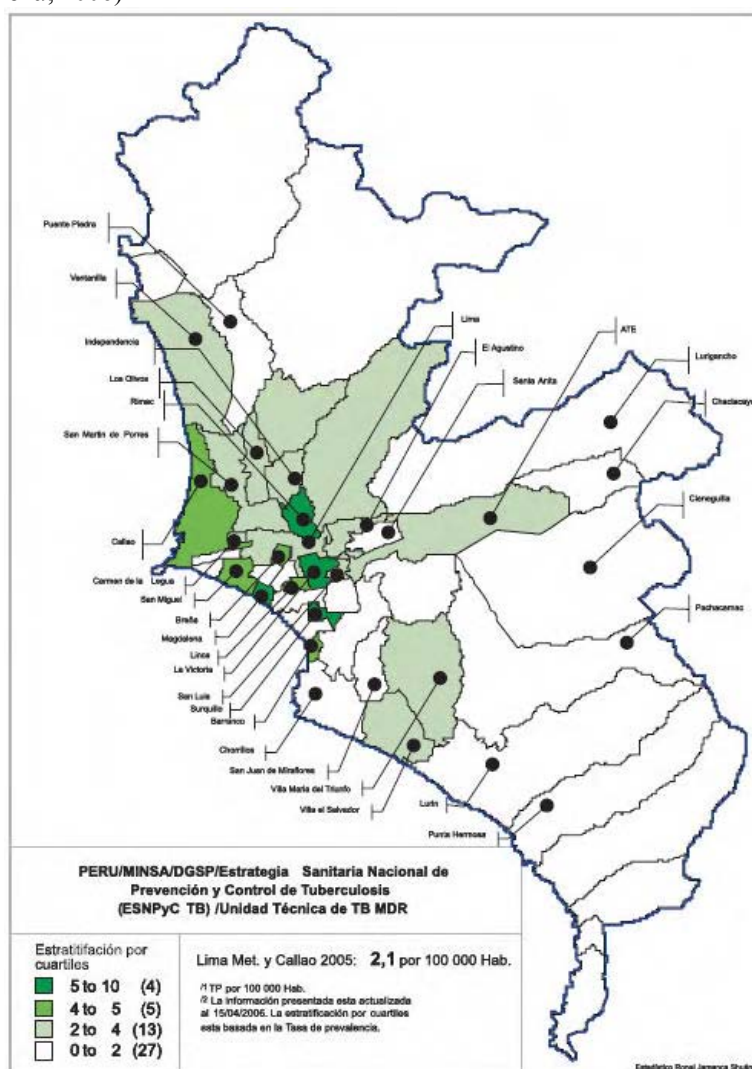


Figura 16. Correlación entre el número de pacientes con VIH/SIDA que son concentrados en el hospital nacional y porcentaje de casos VIH/TB MDR (Perú, 2006)



Fuente: UTTBMDR, ESN-PCT, actualizada al 10.05.06.

Figura 17. Tasa de prevalencia acumulada de VIH/TB MDR en Lima Metropolitana, 1997-2005

III) Los pacientes con antecedentes de infección con tuberculosis tienen igual probabilidad de volver a contraer la enfermedad que los que no poseen antecedentes de contagio (Tabla 10 y Tabla 12). Esta afirmación esta relacionada con las medidas de riesgo de los tipos de resistencia inicial y adquirida dentro de la población en estudio (Tabla 10 y Tabla 15). Por desgracia, investigaciones relacionadas a este tema en el Perú poseen evaluaciones muy someras en los que se registran solo la resistencia primaria de 1 o dos antibióticos (Asencios *et. al.*, 1996; Leo *et. al.*, 2003). La WHO dentro de su registro en referencia a la resistencia de la tuberculosis (Anti tuberculosis drug resistant in the World, 1994-1997) publica una lista de datos con respecto al tema en discusión, en el que señala que del total de una población de 1958 personas infectadas con tuberculosis en el Perú entre los años de 1994-1997, de estos, 231 (15,4%) presentaban **resistencia inicial** y 165 (36%) presentaban **resistencia adquirida**, ambos con respecto a los fármacos (Tabla 18). En el presente estudio el rango de la resistencia inicial es menor que el de la **resistencia adquirida**., podría explicarse este hecho por las características de la población en estudio los cuales provienen de un fracaso terapéutico, de los que cabe decir en su mayoría deben tener y tienen **resistencia adquirida** (WHO, 2006).

Más con respecto al estudio estadístico para este parámetro la interpretación sería la siguiente: El alto riesgo mencionado para la resistencia inicial, esta relacionado con toda la población en estudio “**sin antecedente de tratamiento**” los cuales podrían haberse contagiado con una cepa de *M. tuberculosis* resistente a una o más drogas, y se incluyen también en este grupo las personas que poseen cepas sensibles en su infección los que podrían haber presentado una resistencia primaria en potencia.

Con respecto al riesgo de la resistencia secundaria, la interpretación es que la equidad de riesgos entre los pacientes que poseen o no resistencia secundaria, es debido a dos hechos fundamentales lo cuales serían: i) Los pacientes con resistencia secundaria participaron activamente dentro de los procesos de contagio, tal y como lo demuestran los resultados en la Tabla 15, lo que genera una igualdad de condiciones dentro del ámbito de infección frente a los otros parámetros (Sensibilidad de antibióticos y resistencia primaria), ii) Este hecho también es debido, como se menciona anteriormente a las características de la población en estudio, en los que la gran mayoría de pacientes poseen resistencia adquirida.

PREVALENCE OF DRUG RESISTANCE						
	Primary		Acquired		Combined	
	N	%	N	%	N	%
Total number of strains tested	1500	100	458	100	*	100
SENSITIVE TO ALL 4 DRUGS	1269	84.6	293	64.0		81.5
ANY RESISTANCE	231	15.4	165	36.0		18.5
Isoniazid (INH)	113	7.5	109	23.8		10.0
Rifampicin (RMP)	69	4.6	93	20.3		7.0
Ethambutol (EMB)	24	1.6	28	6.1		2.3
Streptomycin (SM)	131	8.7	79	17.2		10.0
MONORESISTANCE	152	10.1	74	16.2		11.0
Isoniazid (INH)	47	3.1	23	5.0		3.4
Rifampicin (RMP)	23	1.5	16	3.5		1.8
Ethambutol (EMB)	6	0.4	3	0.7		0.4
Streptomycin (SM)	76	5.1	32	7.0		5.4
MULTIDRUG RESISTANCE	37	2.5	72	15.7		4.5
INH + RMP	17	1.1	32	7.0		2.0
INH + RMP + EMB	3	0.2	12	2.6		0.6
INH + RMP + SM	11	0.7	16	3.5		1.1
INH + RMP + EMB + SM	6	0.4	12	2.6		0.7
OTHER PATTERNS	42	2.8	19	4.1		3.0
INH + EMB	3	0.2	0	0.0		0.2
INH + SM	26	1.7	13	2.8		1.9
INH + EMB + SM	0	0.0	1	0.2		0.0
RMP + EMB	1	0.1	0	0.0		0.1
RMP + SM	7	0.5	5	1.1		0.6
RMP + EMB + SM	1	0.1	0	0.0		0.1
EMB + SM	4	0.3	0	0.0		0.2
NUMBER OF DRUGS RESISTANT TO:						
0	1269	84.6	293	64.0		81.5
1	152	10.1	74	16.2		11.0
2	58	3.9	50	10.9		4.9
3	15	1.0	29	6.3		1.8
4	6	0.4	12	2.6		0.7

Tabla 18. Prevalencia de la resistencia a drogas en la población peruana en el periodo de 1994-1996. Con respecto a las resistencias primaria, adquirida (secundaria) y combinada. (WHO, 1997)

IV) Los riesgos de infección en relación a los tipos de resistencia encontrados (Tabla 10, Tabla 13 y Tabla 14), no poseen una interpretación definida con respecto al resto de los parámetros, por lo cual solo son datos referenciales³⁴. Una suposición en este tema es la posibilidad de una doble infección de *M. tuberculosis* en un solo paciente (Small *et. al.*, 1993; Niemann *et. al.*, 2000), lo cual se reflejaría en los resultados de riesgo.

6.1.3. Sobre la distribución geográfica de las cepas de *M. tuberculosis*

En relación a la figura 5A se observa un aumento de la dispersión geográfica de las cepas desde el centro de la ciudad hacia las zonas marginales³⁵, en contraposición observado en las distribuciones geográficas mostradas en Estados Unidos (Munsiff *et. al.*, 2002) y Colombia (Miranda *et. al.*, 2006), dado que en estos países se observa una dispersión geográfica que aumenta desde las márgenes hacia el centro de la ciudad. Este mismo comportamiento también se observa en la figura 5B en relación a las cepas MDR.

La distribución de los pacientes en general (Figura 5A), es debido a un factor de incidencia social, en la cual se muestra a la población empleada infectada con tuberculosis con acceso a un servicio público de salud (ESSALUD), la cual probablemente su mayoría esta en el centro de la ciudad, mientras que las márgenes en donde se halla las poblaciones con menores recursos, probablemente, no poseen este sistema administrativo de salud y son atendidos por establecimientos del Ministerio de Salud, la misma situación se repetiría en el caso de la figura 1B, la cual indica la dispersión de los pacientes MDR y MDR plus. Aunque se debe señalar que en los últimos años si ha existido un aumento de tuberculosis en Lima Metropolitana.

Se puede dar una atingencia al respecto, se señala que en el 2008 el distrito de la Victoria es el distrito que posee la más alta tasa de incidencia de tuberculosis (374 x 100, 000 habitantes), por el contrario el Ministerio de Salud en el año 2005 señala que su tasa de incidencia fue mucho menor a la señalada anteriormente (poseía aproximadamente 35 x 100, 000 habitantes), por lo cual existen 2 hipótesis: i) Existiría la posibilidad de un brote epidémico abrupto que había sucedido entre los años 2005 al

³⁴ Se debe aclarar de que son referenciales con respecto al “*p value*”, la cual es significativa en todos los casos.

³⁵ En sentido contrario existiría una mayor acumulación de cepas en la ciudad que en las zonas marginales.

2008, ó ii) Siempre ha existido una falta de datos en el Sistema de Salud por lo cual no se ha prevenido este hecho.

La presente investigación muestra específicamente a uno de los focos de alta incidencia de Tuberculosis con todas sus variantes de resistencias (sensible, MDR y MDR plus) (El Comercio, 2008). Al parecer este aumento de la tasa de incidencia de la Tuberculosis en el centro de la ciudad ha sido de manera paulatina tal como lo señalan los casos en otros países del mundo (Yang *et. al.*, 1992; van Soolingen *et. al.*, 1999; Foschiani *et. al.*, 2002; Munsiff *et. al.*, 2002), por lo que podría existir errores en los datos que maneja el Sistema de Salud lo cual sería el motivo de este desbalance de reportes con cifras incoherentes, siendo posiblemente el error del MINSA la omisión de los datos de los Servicios de Salud del Seguro Social (ESSALUD) y de los Hospitales de las Fuerzas Armadas y Policiales.

Finalmente, se observa que la distribución de las cepas MDR plus, paradójicamente mantiene una distribución lineal³⁶ y altitudinal³⁷ dentro de este estudio. Lo más probable es que la distribución simplemente sea lineal, en referencia a los distritos en los que se señala, en los cuales también existe una alta incidencia de MDR. También cabe señalar que existiría una falta de datos al respecto, lo cual se vislumbraría de mejor manera en una población de mayor número.

6.1.4. Sobre los niveles de resistencia a fármacos

Uno de los grandes problemas en torno a la tuberculosis en el Perú es la presencia de cepas de *M. tuberculosis* MDR y XDR.

El reporte del año 2005 notificaba la presencia de 2267 casos de MDR, con un porcentaje de morbilidad del 3% en el Perú y notificando además que del total de casos de TB MDR reportados el 62,3% pertenecían a las provincias de Lima y Callao.

³⁶ Es la distribución de una población cuyo transecto grafica una linea recta.

³⁷ Es la distribución de una población en función a los pisos altitudinales. En este caso se observa una distribución desde los 5 m. s. n. m. (Callao) hasta los 2240 m. s. n. m. (San Juan de Lurigancho).

Se ha notificado en nuestro país desde el año 1997 formas clínicas de tuberculosis XDR, reportándose a la fecha un total de 119 casos, de los cuales solo 54 tuvieron tratamiento (Perú, 2007).

La población estudiada presenta un alto porcentaje de presencia de cepas de *M. tuberculosis* resistente a fármacos (63,26%), de los cuales el 48,4% es MDR (Tabla 4), por lo que cabe señalar 4 observaciones: i) La población presenta diagnóstico de fracaso terapéutico, por lo cual es lógico el alto índice de resistencia observado (WHO, 2006) ii) El número pequeño de la muestra en la que quizás se halla seleccionado muchas cepas con esta característica, iii) Esta es una población colectada en 4 meses, por lo que se podría inferir quizás una situación más aguda en cuanto a las resistencias en una población de mayor número (Foschiani *et. al.*, 2005) iv) Existe un alto índice de enfermos con cepas de *M. tuberculosis* con presencia de resistencia a algún fármaco y MDR en el Perú, coincidiendo con los reportes de la WHO y el Ministerio de Salud del Perú.

La resistencia a rifampicina esta a menudo relacionada con la resistencia a isoniacida y a otros fármacos antituberculosos, por lo que el estudio de esta característica es fundamental en la vigilancia de *M. tuberculosis* MDR (Miranda *et. al.*, 2006). Siendo lo preocupante en este estudio los altos porcentajes de resistencia que presenta la rifampicina (46,94%) al igual que la resistencia a isoniacida (48,98%), en una muestra de pacientes de 4 meses, lo que puede suponer una alarma dentro de nuestro sistema de vigilancia, del cual los reportes anuales y el sistema de salud no reparan en la gravedad de este asunto, a pesar de existir reportes de este hecho (Tabla 19) (Perú, 2006).

DROGAS		AISLAMIENTOS	%
SENSIBLES		957	47.5
RESISTENTES	UNA DROGA	INH	40
		SM	168
		EMB	3
		RIF	33
		PZA	2
			0.1
	SUB TOTAL	246	12.2
	DOS DROGAS	INH+SM	79
		INH+RIF	70
		INH+PZA	9
		SM+EMB	2
		SM+RIF	6
		SM+PZA	3
		EMB+RIF	2
		RIF+PZA	2
			0.1
			0.1
	SUB TOTAL	173	8.6
	TRES DROGAS	INH+SM+EMB	13
		INH+SM+RIF	157
		INH+SM+PZA	10
		INH+EMB+RIF	17
		INH+EMB+PZA	1
		INH+RIF+PZA	41
		SM+EMB+RIF	1
	SUB TOTAL	240	11.9
	CUATRO DROGAS	INH+SM+EMB+RIF	118
		INH+SM+EMB+PZA	8
		INH+SM+RIF+PZA	90
		INH+EMB+RIF+PZA	13
		SM+EMB+RIF+PZA	1
	SUB TOTAL	230	11.4
	CINCO DROGAS	INH+SM+EMB+RIF+PZA	168
	TOTAL RESISTENCIA	1057	52.5
MDR		674	33.5
TOTAL		2014	100.0

Tabla 19. Resultado de la prueba a susceptibilidad a drogas antituberculosas de primera línea. INS-2005. Como se observa en esta muestra, los porcentajes de resistencia más altas lo poseen SM, INH y RIF, y los números aumentan cuando se nombran interacciones de resistencia entre ellas (Perú, 2006).

Cabe resaltar que en el presente estudio se notifican nuevos tipos de resistencias a las drogas no registrados, como lo son las relacionadas a la tioacetazona (Tb1) y ácido para amino salicílico (PAS) en casos de resistencia a más de dos drogas. Además se reportan casos que presentaban resistencia hasta de 8 drogas (Casos MT016 y MT050).

Dentro de los casos de interés a resaltar -que se señalan en los resultados- son los de la niña de 15 años hospitalizada en el servicio de Neumología la cual presentaba fiebre y fue diagnosticada y tratada de Neumonía, y dada de alta aliviada, para luego reingresar a los siete días con dolor torácico, tos, expectoración y fiebre, siendo catalogada como un derrame pleural de etiología tuberculosa (Bk+), cuyo perfil de resistencia a los fármacos demostró ser una cepa de *M. tuberculosis* MDR.

Y el de los dos trabajadores de salud infectados con una cepa *M. tuberculosis* sensible. Es claro que el riesgo de infección de tuberculosis en los trabajadores de salud es alto y ha sido reconocida como tal desde hace muchos años (WHO, 1999, Pai *et. al.*, 2005; Joshi *et. al.*, 2006). En los meses de ejercicios de la parte practica de esta tesis en el

hospital ocurrió un pequeño brote de TB a nivel del laboratorio³⁸ en la que dos trabajadores del mismo área de trabajo enfermaron, era un hecho que había tenido sus antecedentes hace aproximadamente 10 años atrás (ver Alonso-Echanove *et. al.*, 2001) y en otros lugares del mundo (MMWR, 1991; Pearson *et. al.*, 1992; Garret *et. al.*, 1999; Granich *et. al.*, 2003).

6.2. Estudio genotípico molecular

El dendograma de la figura 9 muestra que en la población en estudio existe una baja clonalidad³⁹ y un alto número de polimorfismos genotípicos en las cepas, estos datos son concordantes con lo hallado por Baldeviano *et. al.*, 2003 y Capcha *et. al.*, 2005 en el Perú, y a diferencia de lo que ocurre en otros países, en los cuales existe una alta clonalidad y un bajo número de polimorfismos genotípicos relacionados con esta bacteria, como por ejemplo los son los estudios publicados por Yang *et. al.*, (1992) en Dinamarca; Van Soolingen *et. al.*, (1995 y 1999) en el este de Asia y Holanda respectivamente; Munsiff *et. al.*, (2002) en Estados Unidos y Diaz, (2003) en Cuba.

En general, en todos estos estudios mencionados se encuentran grandes agrupaciones de cepas con igual genotipo, siendo raro encontrar clonas aisladas como sucede en gran número en el Perú, pero además los genotipos de estas agrupaciones tienden a desaparecer a lo largo del tiempo, como lo descrito por Van Soolingen *et. al.*, 1999, quedando un menor número de agrupaciones y de genotipos diferentes a lo largo de los años.

Además los descubrimientos más alarmantes que se ha hecho y que son los puntos más interesantes de este estudio, son: i) el alto polimorfismo de genotipos dentro de la población de *M. tuberculosis* MDR en estudio, los cuales en la gran mayoría de los casos no son ni siquiera cercanamente comunes como los reportados por Kubin *et. al.*, (1999); Alito *et. al.*, (1999), Samper *et. al.*, (2005); y Man Kam *et. al.*, (2005). Todos encontraron, en especial los dos últimos casos, grandes grupos de cepas MDR con un

³⁸ Dos muestras de ese brote ingreso dentro de la investigación, ambos tuvieron perfiles con una baja similaridad (0,10), y hasta uno de los casos posee una similitud mayor a 0,8 con una cepa atípica de *Mycobacterium*.

³⁹ Entiéndase como clonalidad a la evolución y dispersión de un sólo gen, un solo grupo de genes o una sola cepa de una bacteria de forma local o mundial como respuesta a cambios ambientales. (ELS 2001)

patrón igual y otros más pequeños con un patrón diferente caso contrario al caso peruano, y ii) La igualdad de genotipos entre cepas sensibles, o que poseen resistencia a uno o dos fármacos, con cepas MDR, y de cepas con resistencia a un fármaco con cepas MDR plus, siendo estos casos registrados en el Perú (Baldeviano *et. al.*, 2003) y en otros países de Sudamérica (Foschiani *et. al.*, 2002; Miranda *et. al.*, 2006)

6.2.1. Alto Número de polimorfismos en *Mycobacterium tuberculosis* MDR

Para sustentar la discusión del punto (i) del párrafo anterior, se refiere lo siguiente: Bajo la técnica de RFLP-IS6110 Alito *et. al.*, (1999) postularon la posibilidad de una inestabilidad de esta secuencia de inserción (IS6110) que generaría una variante genotípica en relación con las mutaciones referidas para la MDR, en referencia al hallazgo de dos perfiles genéticos diferentes en dos cepas TB MDR. Para aquella época esto era inconcebible, dado que se pensaba que todos los tipos de MDR deberían tener una mutación igual y por ende un perfil genético igual, añadiendo los posibles brotes de este tipo de bacteria. El tema fue discutido entre Stefan Nieman y Dick Van Soolingen (Niemann *et. al.*, 1999) (ambos personajes de referencia dentro de los estudios con *M. tuberculosis*), Nieman postulaba de que era imposible de que exista una alta inestabilidad de la secuencia de inserción IS6110, bajo la hipótesis anteriormente citada, y que era muy posible un error en el proceso de la ejecución de la técnica del RFLP, Van Soolingen defendió a su co-autora refiriendo de que los movimientos de las secuencias de inserción eran más que probables dentro del genoma de *M. tuberculosis*, tal y como lo muestran los resultados.⁴⁰

Imaginemos que por un pequeño movimiento de una bacteria MDR se origino este debate, en el caso de la presente investigación⁴¹, la población MDR es del 48% y la gran mayoría tiene genotipos totalmente diferentes entre si, sin contar: con las cepas MDR plus, los que manifiestan otros tipos de resistencia y las cepas sensibles a las drogas que poseen la misma variabilidad.

⁴⁰ Se hace la referencia que en la actualidad se acepta que el índice de agrupamientos entre una cepa TB sensible y TB MDR dentro de un estudio epidemiológico molecular es muy bajo (van Soolingen *et. al.*, 1999; García-García *et. al.*, 2000)

⁴¹ Teniendo en cuenta de que los primers con específicos a sus secuencias y que debería por lo menos manifestar un producto en común (de 860 pb) como se detalla en los resultados.

Y cabe señalar, que este evento también se ha visto en otros países sudamericanos (Foschiani *et. al.*, 2002; Miranda *et. al.*, 2006) pero, en poblaciones muestrales mucho más pequeñas que en nuestro país⁴². Por lo que la pregunta sería ¿Cuál es el significado de esto?

En estos últimos años ha sido sugerido que los eventos mediados por las delecciones de las secuencias de inserción son un mecanismo importante en la variación génica de *Mycobacterium tuberculosis*, además se ha especulado que podrían estar envueltos en procesos de inmunopatogenicidad (Katto-Maeda *et. al.* 2001).

Las secuencias de inserción en general, tienen la capacidad de replicarse y pueden también estar envueltos en inserciones y recombinaciones en sitios específicos, sumado a que tienen una gran variedad de formas de rearrreglos cromosómicos (Martiel y Blot 2002; Chalmers y Blot 1999), y a su vez están directamente relacionadas con procesos de mutagénesis de diversos tipos (Rodríguez *et. al.*, 1992). Algunas investigaciones señalan mutaciones benéficas para la bacteria (Cooper *et. al.* 2001; Treves *et. al.* 1998; Chalmers y Blot 1999) y se menciona de procesos de evolución del que es participe esta bacteria en relación a estas secuencias (Fang *et. al.*, 1997; Blot 1994).

En resumen las secuencias de inserción como la IS6110, están implicados en mecanismos de delección, primeramente de ellas mismas, por efecto de una transposición de esta hacia otro lugar (Mahillon and Chandler, 1998; Schneider *et al.*, 2000; Cooper *et. al.*, 2001), segundo existen delecciones de un fragmento genético dentro de un locus específico por efecto de la inserción de esta secuencia en el lugar que ocupaba el mencionado fragmento (Fang *et. al.*, 1998; Mathema *et. al.*, 2006), hay mecanismos de delección por recombinación homologa (Sampson *et. al.*, 2003; Fang *et. al.* 1998), y hay mecanismos de duplicación, en el que posiblemente existan otros mecanismos que permitan el funcionamiento de esta actividad (Fang *et. al.* 1998) (Figura 18 A). En general, todos los mecanismos se interrelacionan. Existe un caso especial en el que hay una correlación entre mecanismos de transposición, inserción, duplicación y delección, como lo muestra el modelo B de la figura 18, en el que primero existe una transposición de la secuencia el cual se inserta en una secuencia génica, luego

⁴² Esto es en relación a las poblaciones con cepas resistentes, en el que nuestro país es uno de los que presenta índices más altos en relación a esta característica en *M. tuberculosis* en Sudamérica.

del cual se duplica, y finalmente por efecto de una recombinación homologa y a la acción de las proteínas RecA, existe una delección de uno de los duplicados (Fang *et. al.* 1997,1998).

En el caso de las secuencias repetitivas como las de Mtb2 estas poseen mecanismos de delección y transposición (Belkum *et.al.*, 1998; Dos Vultos *et. al.*, 2008), como anteriormente se ha señalado con mayor detalle, existen mecanismos de variación genética generadas por las mutasas (Moxon and Wills, 1999; Radman, 1999), estos eventos conllevan a que las bacterias obtengan una gran variabilidad de secuencias PE-PGRS, de los cuales por efecto del azar, una de esas variantes generarían mejoras a la resistencia de la bacteria hacia el sistema inmune.

Como se observa en las postulaciones se afirma acerca de procesos que implican el movimiento de este tipo de secuencias, pero por la complejidad del genoma de *Mycobacterium* cuya capacidad de variabilidad es “limitada”⁴³, en comparación a otras bacterias, al ser ella misma la que debe crear sus propios cambios genéticos por no poseer mecanismos de transferencia horizontal, tal y como defendió Nieman, estas variaciones deberían de ser mínimas en una población⁴⁴, pero en el Perú sucede todo lo contrario, lo mas probable es que todos estos mecanismos no se han realizado todas en un mismo tiempo o en un tiempo limitado, por lo que podemos afirmar que aparentemente lo que se observa es a un gran conjunto de especies que han variado sus genomas a lo largo de un gran periodo de tiempo, del proponemos que son el motivo del alto número de polimorfismos observados, los cuales son indicadores de un proceso de evolución hacia otras especies drogoresistentes de mayor envergadura, siendo una de ellas las especies XDR.

Lo más preocupante es que estos datos concuerdan con los datos del Ministerio de salud del Perú (Perú, 2006), y es que existe una gran población de personas infectadas con tuberculosis que no se han curado y se siguen acumulando a lo largo del tiempo, siendo la gran mayoría de estos casos de MDR y últimamente XDR.

⁴³ Es relativa esta afirmación, dado que al no tener mecanismos de transferencia horizontal, esta bacteria mejora los mecanismos que ya tiene, lo cual compensa esta falta (Dos Vultos, 2008).

⁴⁴ Cabe acotar la postulación de Cave *et. al.*, 1991 en el que afirma que los eventos de transposición de esta secuencia se da cada 58 años.

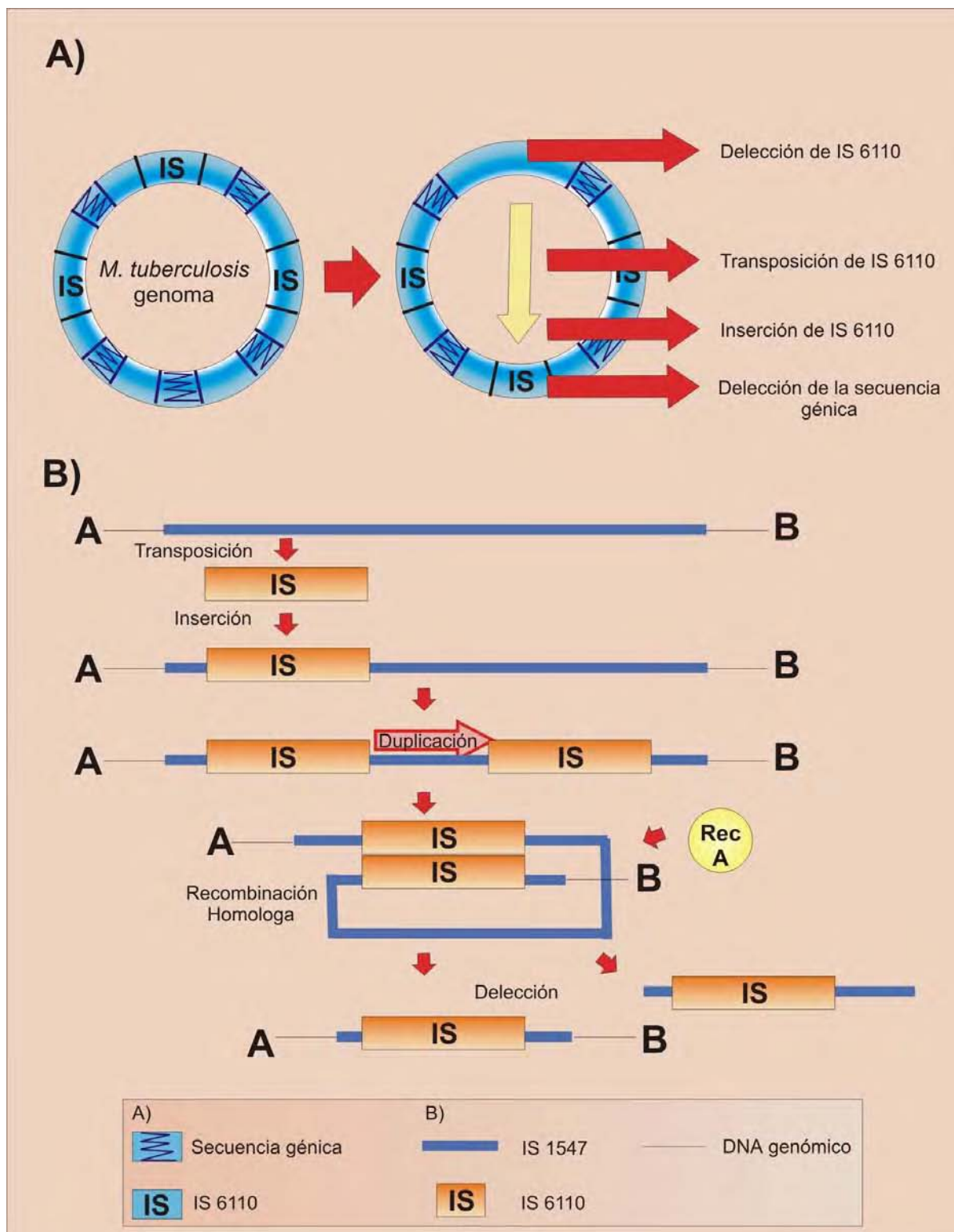


Figura 18. A) Mecanismos de recombinación genética realizados por la secuencia de inserción IS6110 dentro del genoma de *M. tuberculosis*. B) Modelo publicado por Fang *et. al.*, (1998) sobre los mecanismos utilizados por la secuencia de inserción IS6110 en relación con la secuencia IS1547.

A partir del 2007 se inició la discusión sobre la evolución de *Mycobacterium tuberculosis* con respecto a su capacidad de generar mecanismos de resistencia hacia los antibióticos, comenzando con la publicación de Pillay y Sturn, 2007 y bajo ese mismo contexto se observa el comentario de Iseman, 2007, que bajo una recopilación teórica de todos los hechos que concierne al proceso de XDR, apoya la conclusión de una evolución de *M. tuberculosis* para dicho fin, el estudio matemático de Goldman *et. al.*, 2007, que además de tener la misma conclusión opina sobre un futuro incierto para esta bacteria, y el trabajo del Instituto Pasteur, realizado por Dos Vultos *et. al.*, 2008, los cuales postulan un mecanismo fundamental en *Mycobacterium* para su evolución el cual llaman 3R (Recombinación, reparación y replicación), sustentando su postulación en el estudio de las secuencias SNPs, en lo que encontraron este tipo de mecanismo y cuyas variaciones en cuanto a los polimorfismos, los compararon con las secuencias housekeeping de otras especies. Agregan además, de que la falta de fidelidad en los mecanismos de mantenimiento del genoma de *Mycobacterium*, podría servir como punto de partida para la evolución de esta bacteria en relación a la resistencia de los antibióticos, patogenicidad y para la obtención de un *fitness* que le permita sobrevivir, posiblemente obteniendo avances selectivos en situaciones de estrés específicas, como es en el caso de la supervivencia en un medio con drogas.

En referencia a las secuencias de inserción, el cuestionamiento sería: ¿Cuál sería la causa por la cual generan diferentes perfiles genotípicos en los estudios epidemiológicos moleculares? y ¿Porque crea tan alto número de polimorfismos genéticos en Sudamérica a diferencia de otras partes del mundo?

Existe un postulado evolutivo en el que todo carácter que de alguna manera es perjudicial para una especie, desaparece en el tiempo. Olvidando un poco los antecedentes, nosotros tenemos una secuencia de inserción que hace mutar a la bacteria, que muchas veces inactiva genes y puede crear inestabilidad en el genoma; pero ¿porque sucede todo lo contrario?, ¿porque no desaparece y al contrario permanece en un genoma en el cual mantiene su estabilidad? (Dos Bultos *et. al.*, 2008) y hasta crea mutaciones benéficas que conllevan a una evolución (Martiel and Blot, 2002)⁴⁵.

⁴⁵ . En el caso del estudio las secuencias de inserción no han desaparecido y más bien han variado demasiado, teniendo como supuesto, de que estas secuencias tienen más poder de movimiento que las

Se ha hallado que las secuencias de inserción pueden estar relacionadas con la evolución de una bacteria y se ha hablado de secuencias repetitivas con el mismo fin. Martiel y Blot en el 2002 publicaron el primer caso, en el cual generan un modelo matemático para el estudio evolutivo de las secuencias de inserción dentro de *Escherichia coli* en un lapso de tiempo, del cual tuvo resultados muy interesantes, dado que hallaron en su población de que las mutaciones creadas por las secuencias de inserción eran benéficas para las bacterias y a lo largo del tiempo incrementaban el fitness⁴⁶ hasta un límite relativamente alto, el cual se mantenía hasta el final del estudio. Aunque, cabe señalar, que en el mismo periodo de tiempo este tenía una baja probabilidad de generar alguna evolución. Este experimento se realizó dentro de un ecosistema ideal para la bacteria, por lo que la pregunta sería ¿qué ocurriría en un medio con drogas para *M. tuberculosis*? y ¿qué relación tendría con la MDR?, por lo que se decidió escribir a Martiel (L'Institut IMAG de Francia) por esta pregunta, el cual primeramente lamenta no poder contestar completamente dado que el indicado para este tema era el fallecido Blot, aunque señala que su metodología puede usarse en el caso de *M. tuberculosis* y muy posiblemente con las mismas conclusiones, y que los factores de resistencia generan cambios en cuanto al tiempo de evolución, según entendemos, dado que es otro factor externo de estrés a la bacteria que bien puede inhibir o aumentar la capacidad de replicación de esta secuencia y por lo tanto subir o bajar el fitness y la probabilidad de evolución (Comunicación personal con Martiel, 13 de Febrero del 2008).

Lo que en parte deja en claro su respuesta es que las secuencias de inserción tienen un fin en cualquier bacteria, y también que para llegar a ese fin deben de seguir un orden, en el que al parecer todos los microorganismos de una misma especie lo siguen y llegan a una meta que es un bienestar completo de la bacteria.

Este manifiesto concordaría con lo que anteriormente se citó con las declaraciones de Niemann, dado que si bien todos tienen el mismo orden también deben de manifestar las

secuencias repetitivas relacionadas con las secuencias Mtb2. En el Perú no se ha hallado o se ha hallado poco la desaparición de secuencias IS6110, a diferencia de otros países (Díaz 2002).

⁴⁶ El fitness es una medida de la habilidad de un organismo a sobrevivir, a reproducirse, y en el caso de los microorganismos, a ser transmitido.

mismas características (llámese fenotipo o genotipo), pero al parecer este orden tiene sus ramificaciones, lo que justificaría lo encontrado por Alito.

Por otra parte se halló un estudio con similares fines en *M. tuberculosis*, pero en el que solo estudiaba la diferencia de los costos de fitness en cepas resistentes (Gagneux *et. al.* 2006). Ellos estudiaron los fitness relacionados a los tipos de mutación referidas al gen *rpoB* (Resistencia a Rifampicina) en el que compararon muestras clínicas con muestras inducidas a esta mutación, se observó que las muestras clínicas que mantenían la mutación *rpoB* S531L tenían un fitness más elevado que el límite concedido para este tipo de *M. tuberculosis*, además manifestaron la existencia de una heterogeneidad en relación a los costos de fitness en estos tipos de cepas, y dijeron textualmente: “Dos situaciones alternativas podrían acontecer para que exista el elevado fitness observado en cepas clínicas que poseen la mutación *rpoB* S531L. Primero, esta mutación podría en efecto ser una mutación sin costo para este tipo de cepas. Segundo, que ha pasado el tiempo suficiente para el aislamiento entre la cepa sensible y los miembros resistentes, mutaciones compensatorias podrían haber surgido y ayudado en el bajo costo de fitness inicial asociado con esta mutación, similar a lo observado en otras especies bacterianas” “Nuestro trabajo sostiene los mas complejos modelos (matemáticos) y sugiere que la heterogeneidad en los fitness es una función de la mutación para la droga resistencia, de los linajes genómicos, y potencialmente de una evolución compensatoria”.

Esta evolución compensatoria es referida a una drogoresistencia capaz de incrementar su fitness hasta una estabilidad absoluta en cualquier medio, lo cual coincide con la conclusión de Martiel y Blot. Entonces añadiendo a lo anterior no solo hay un orden, sino que hay un fin, que es la evolución de esta bacteria hacia una bacteria drogoresistente mejorada.

La parte teórica narrada sirve para sustentar los siguientes hechos: i) Los cambios estructurales generados por las secuencias de inserción y las secuencias repetitivas son factibles y observables en los diferentes perfiles observados en los estudios epidemiológicos moleculares relacionados con estas, ii) El Perú posee una situación crítica en relación al sistema de tratamiento impuesto, dado que no ha podido corregir errores pasados, en los que desde la época de 1990 ya había presentación de cepas MDR y XDR. El alto polimorfismo genotípico visto en las cepas en el estudio expresan la

presencia de muchos genotipos “antiguos” que no han desaparecido, de los cuales muchos son referidas a pacientes con cepas que presentan resistencia a las drogas, y que a lo largo del tiempo han generado otros nuevos genotipos los cuales a su vez estos últimos han generado otros mas en diferentes portadores o huéspedes, este proceso de tan largo periodo de tiempo ha creado una estabilidad en las bacterias a un nivel que es muy probable que tengan fitness elevados como lo mencionan Martiel, Blot y Gagneux, que los esta llevando a una evolución compensatoria del cual parte de ella son las cepas XDR que se observan en la investigación.

Se debe incidir en lo dicho por Díaz (Instituto Pedro Kouri de Cuba, Comunicación personal con Díaz, 15 de Abril del 2008), en su afirmación de que la estabilidad de un patrón basado en la secuencia de inserción IS6110 es de 2.5 años. Volviendo a observar el dendograma generado en esta investigación (Figura 9), ¿Cuántos años han circulado las cepas de *M. tuberculosis* en el Perú y cuanto han variado sus genomas desde el inicio? De forma general, se calcula en base a este estudio, que la generación de todas estas cepas ha tenido más de 25 años de circulación⁴⁷, y en la actualidad existen una cantidad tal de polimorfismos genéticos que es difícil mencionar de la aparición de una pandemia de tuberculosis generada por una sola cepa.

Como punto aparte, en una especie de comparativo, en Europa la presencia de un bajo polimorfismo se debe en que en estos países ante la presencia de un brote de tuberculosis, la cepa causante se eliminaba casi de forma completa quedando algunos remanentes que quizás en los años vuelvan a aparecer con un patrón genotípico igual o diferente a su origen.

El esquema que se coloca posteriormente (Figura 19) muestra una parte del total que ocurre en el Perú, tenemos una cepa patrón que genera otras dos cepas con genotipos distintos con respecto a las secuencias IS6110, y estas a su vez generan otras más, algunas de ellas generaran brotes y en otras podría desaparecer la secuencia de inserción. Pero esto ocurre a lo largo de los años, y lo que ocurre en el Perú es

⁴⁷ En un calculo grosero, se tomo en cuenta que las 14 agrupaciones obtenidas en el estudio, los cuales corresponderían a la presencia de 14 cepas madres o de origen, si se observa la formación de polimorfismos de forma lineal en el tiempo se tomaría el producto de las 14 agrupaciones por 2,5 años que tiene de estabilidad el patrón de IS6110, para tener como producto el número de años que estuvo la bacteria circulando en una población y modificando su genoma (35 años).

duplicado por cientos de veces⁴⁸. Lo cual manifiesta que son muchas cepas que a lo largo del tiempo no han desaparecido y más bien siguen mutando, algunas se han hecho MDR y otras son XDR, pero todas siguen su camino hacia una Roma hipotética, la cual es una especie totalmente resistente a las drogas con un fitness viable y que se adecue a cualquier medio.

Cabe señalar que a este último hecho se suma la presencia de cepas *M. tuberculosis* que son adquiridos por un individuo, pero que no manifiestan la enfermedad, casos que ocurren en los nativos de la Sierra del Perú, en los cuales independientemente su cepa genera sus modificaciones moleculares. Estos casos también tienen la capacidad de infectar a otros individuos por contagio, por lo que este evento se convierte en otro apéndice dentro de todo el proceso de evolución antes citado.

⁴⁸ Este hecho también se sustenta por la existencia de muchos enfermos de TB desde la década de 1990, en su mayoría MDR (Perú, 2006)

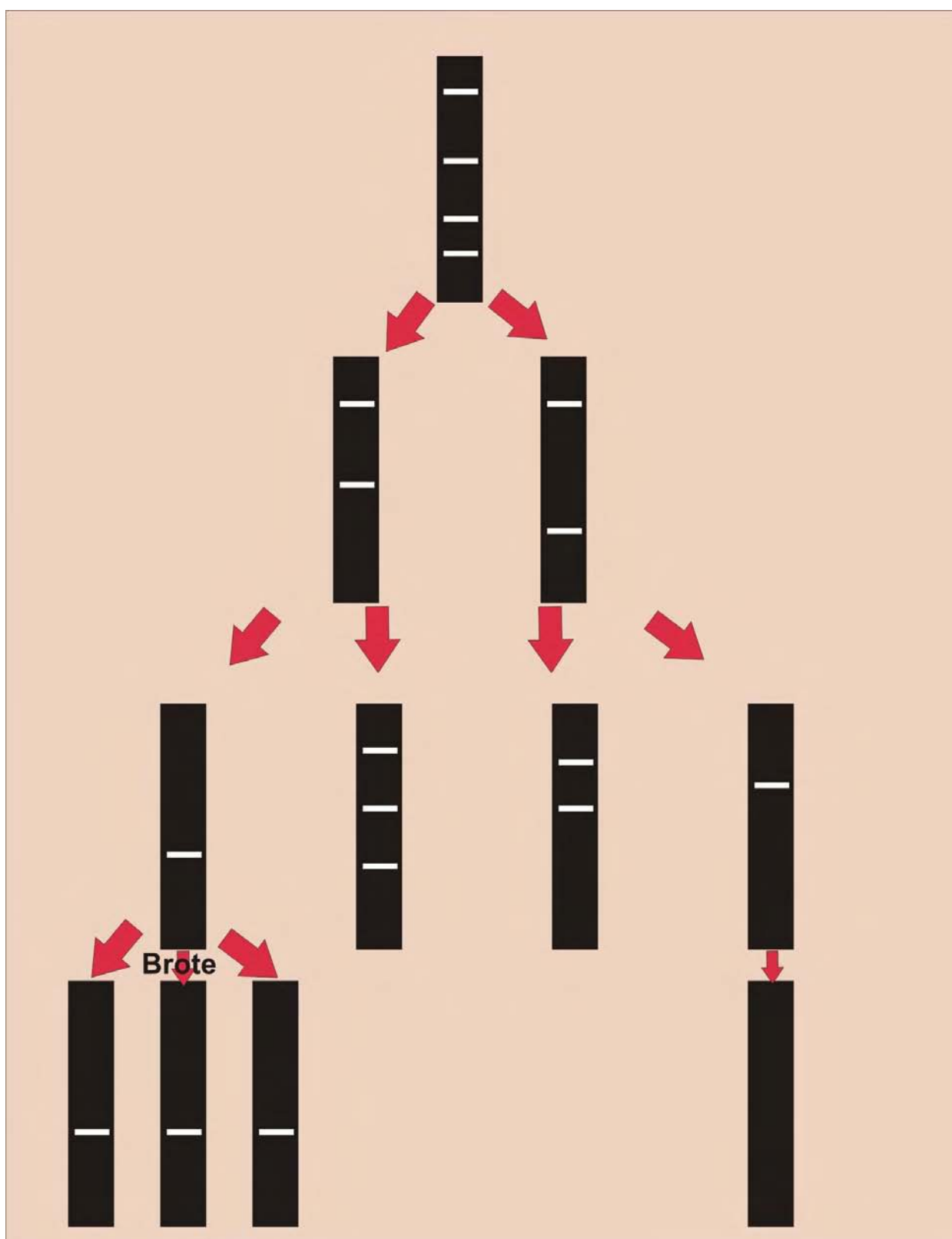


Figura 19. Esquema que explica el alto polimorfismo genético visto en el Perú.

6.2.2. Relación Cepa Sensible Cepa MDR

El estudio que se realizó con las cepas KZN muestra algo que hasta el momento en que se redacta esta tesis, parecía tan solo hipotético, una relación directa entre una cepa sensible a todas las drogas y una cepa MDR, como lo muestran los *clusters* I y IV específicamente, teniendo ambos un 100% de coeficiente de similitud.

Pillay y Sturn han publicado sus estudios en los genotipos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de la población de KwaZulu-Natal en el 2007, como se cito anteriormente. Ellos partieron de la base de los genotipos de las cepas F15, LAM4 y KZN, todas estudiadas en esta localidad, los cuales volvieron a encontrar en la mayoría de los casos, pero haciendo un seguimiento a lo largo del tiempo de estos genotipos, vieron que estos variaron hacia formas MDR, en muchos casos por un mal tratamiento, tratamientos empíricos o negligencias del paciente, ellos discuten de que estas prácticas generarían una alta presión selectiva que generarían cepas MDR o XDR en corto plazo (2-5 años), más deja entrever una relación estrecha entre estas cepas “base”, como ellos los denominan, con las cepas MDR y XDR encontradas posteriormente. Además mencionan de una evolución de *M. tuberculosis* para dicho fin.

Si observamos el pequeño dendograma de la figura 12 y el dendograma del estudio de los genomas (Figura 14) de *M. tuberculosis*, vemos, en ambas, en relación a las ramas formadas por los KZN, por un lado a KZN 1435 y KZN 4205, los cuales pertenecen a las cepas MDR y sensible a todas las drogas respectivamente, los cuales poseen una mayor similitud entre ambos que con KZN 602. Este hecho explicaría las sospechas de Pillay y Sturn, dado que estas similitudes, en especial las relacionadas a las cepas sensibles y la MDR, indicarían el corto tiempo de diferenciación de los genomas entre ambos tipos de cepas, teniendo en cuenta que el punto de partida entre las cepas es la del tipo sensible. Pero en mi caso los *clusters* I y IV, el cual relaciona el caso de un paciente con una cepa MDR con otro paciente que poseía una cepa sensible a las drogas, tienen una relación del 100% de similitud, lo cual me generaba la duda si es que esto significa una tendencia de la cepa sensible a ser resistente o podría ser otro motivo por el que sucede este hecho, pero bajo la hipótesis de la investigación anterior, sustentaría este manifiesto: “Una cepa sensible puede tener un genotipo igual que una cepa resistente”, a lo cual vendría la pregunta ¿porque sucede esto?

Para agregar, en relación a los datos mencionados, en una investigación hecha en Colombia (Miranda *et. al.*, 2006) se hallaron similares resultados: Cepas MDR relacionadas con un 100% de similaridad con cepas sensibles o con otros tipos de resistencia, en Brasil hallaron algo parecido (Foschiani *et. al.*, 2002), pero no lo discuten. En el Perú (Baldeviano *et. al.*, 2003), se ha hallado también relaciones entre cepas MDR o cepas que poseen otros tipos de resistencia con cepas sensibles, resultados que tampoco se discuten.

Un dato interesante dentro de la investigación de Pillay y Sturn, es que además mencionan de un proceso de resistencia para llegar a MDR, en el cual pasaría primero por una resistencia a SM y EMB o INH y SM, por mencionar dos de los casos, para luego llegar a MDR. En mi investigación encontré casos puntuales de relación de este tipo de cepas con casos MDR, como los son: El *cluster* III que relaciona una cepa resistente a INH y SM con un MDR; el *cluster* V, una cepa Sensible a las drogas con una cepa resistente a SM y el *cluster* VI, una cepa sensible a todas las drogas con una cepa resistente a INH, SM y TIO. Pero en el *cluster* VII, una cepa resistente a SM tiene una similaridad del 100% con una cepa MDR plus⁴⁹.

La primera postulación es que estas similaridades del 100% podrían indicar que “la cepa sensible ha sufrido los mismos cambios genotípicos y de mecanismos moleculares que la cepa MDR, por lo que se puede inferir que ambos casos pertenecen a una misma cepa o quizás a un mismo origen”. Lo cual se pondrá en tela de juicio bajo dos puntos de vista diferentes para analizar la veracidad de esta afirmación⁵⁰

6.2.3. Dos postulados bajo el principio de la parsimonia

El principio de parsimonia se basa en el postulado de Guillermo de Ockham: “*Entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem*” (“No ha de presumirse la existencia de más cosas que las absolutamente necesarias”). Usado por muchos investigadores, evoca al camino más corto o a la solución más rápida hacia una conjetura. En términos

⁴⁹ Estas afirmaciones están muy relacionadas con el trabajo de David, 1970 hecho que luego mencionare.

⁵⁰ Al parecer la técnica usada en la investigación es más sensible a mostrar estas relaciones que otras técnicas como el RFLP o el Spoligotiping, los cuales también tienen sus diferencias en cuanto a discriminar diferencias genotípicas puntuales.

evolutivos es el conjunto de mecanismos más viable para la evolución de una especie a otra.

Bajo esta postulación se colocan dos puntos de vista:

Tenemos una primera postulación, la cual es el punto de vista de los epidemiólogos moleculares que estudian a *M. tuberculosis*, en la cual ellos sostienen que los resultados mostrados, igualdad de cepas sensibles con MDR, son probables y explicables, dado que se pueden obtener los casos de fenotipos iguales con genotipos iguales, fenotipos diferentes con genotipos iguales o fenotipos diferentes con genotipos diferentes, por lo cual los sucesos que relato son independientes, y pueden haber sucedido por el azar, por lo cual mi punto de vista en el que ambos casos tuvieron los mismos mecanismos moleculares y pertenecen a una misma cepa o a un mismo origen no tendría sustento (Comunicación personal con Diaz, Instituto Pedro Kouri de Cuba, 22 de Enero del 2007)

Más nuestra segunda postulación es la siguiente, bajo el principio de parsimonia pongo a prueba el siguiente dilema: Por ejemplo una persona que vive en Lima y esta infectado con TB sensible cuya cepa posee el mismo genotipo que una persona con TB MDR en Cuzco, cuales serían las explicaciones para el caso, según el punto de vista anterior si son hechos independientes la cepa del limeño ha tenido las mismas modificaciones moleculares que la cepa cuzqueña de forma independiente, al azar y sin contacto entre ellas. Este evento, como se observa, posee una acción cuya probabilidad es muy baja, dado que apela a la aparición de clonas iguales dentro de condiciones diferentes (presión selectiva y adaptativa, medio ambiente y tiempo). Mas nuestro punto de vista encuentra mucho más probable la posición de que la cepa sensible del limeño sea la misma que el cuzqueño pero con la manifestación de un fenotipo MDR.

Narrando una parte del proceso de la investigación, se tiene un primer postulado en que esta igualdad de genotipos podría indicar una tendencia de la cepa sensible a ser MDR, dado el largo tiempo de mutaciones continuas que han sufrido las cepas de *M. tuberculosis* en el Perú pudieran haber dado a todas las cepas un factor de tendencia, en este caso a la MDR o XDR, y debido a que estos procesos de modificaciones moleculares realizadas por las secuencias de inserción y las secuencias repetitivas, las cuales son base de esta investigación, conllevan cambios muy radicales, como lo son

delecciones de más de 1000pb o transposiciones de secuencias de igual número, modificaciones de genes e inactivaciones de las mismas, por lo cual, como se observa y anteriormente se sustentó, no son simples cambios estructurales.

En ese sentido nos llevo a pensar a que era imposible el hecho de que ocurra lo mismo o algo parecido entre dos cepas distintas y que en forma independiente se creen perfiles genotípicos iguales y era mucho más probable de que el hecho se tratara de un conjunto de mecanismos similares⁵¹, sino iguales, para un fin que es la resistencia a antibióticos, y por ende se encuentran genotipos iguales dentro de cepas que aún no han completado la mutación, debido a que son parte del proceso. Pero para sustentar ello nos faltaría dos pruebas, i) verificar si este proceso sucede en verdad, experimentando in vitro y luego in vivo en animales de laboratorio y ii) encontrar la cepa que manifieste esa perfección que se manifiesta.

Y un segundo postulado sería el siguiente: Como se mencionó referencialmente en relación al trabajo de Pillay y Sturn, ellos mencionan algo muy parecido a un trabajo relativamente antiguo pero que podría explicar su hipótesis y la nuestra. La secuencia de resistencias para llegar a la MDR tiene una explicación para estos casos específicos en las siguientes líneas. En 1970 Hugo L. David publicó su investigación llamada “Probability Distribution of Drug-Resistant Mutants in Unselected Populations of *Mycobacterium tuberculosis*”, era la conclusión de una serie de investigaciones hechas en la época en relación a la aparición al azar de bacterias resistentes a los fármacos antituberculosos dentro de una gran concentración bacteriana sensible a estas. Textualmente los resultados fueron los siguientes: “Las mayores proporciones de mutantes observados fueron $3,5 \times 10^6$ y $3,1 \times 10^6$ para, respectivamente, INH, 0,2 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$ y $3,8 \times 10^6$, $3,1 \times 10^8$ y $0,5 \times 10^4$ para respectivamente, STM, Rif y Eta” (David, 1970)⁵². En la actualidad este evento es tomado como una de las causas primarias de la droga resistencia en TB y de los brotes de TB MDR. Como se mencionó anteriormente, dentro de grandes concentraciones bacterianas aparecen proporciones pequeñas de bacterias resistentes a un solo fármaco, como lo son por ejemplo a 1×10^6 UFC aparecen bacterias resistentes a INH y 1×10^8 UFC a RIF, pero a mayores concentraciones (1×10^{14} UFC) aparecen bacterias con resistencias a los dos fármacos

⁵¹ Añadiendo de que las secuencias de inserción tienen puntos específicos en donde insertarse.

⁵² Aunque no lo nombra las concentraciones están en UFC.

(Bastian and Portaels, 2006). Una de las mayores causas de este suceso es cuando el paciente no sigue su terapia o tiene un inadecuado régimen de tratamiento, por lo cual aumenta exponencialmente su carga bacteriana originando la aparición de estos mutantes (Comunicación personal con Díaz, Instituto Pedro Kouri de Cuba, 15 de abril del 2008). En el caso de la investigación estos mutantes resistentes que pertenecían a pacientes con cepas de fenotipo sensibles fueron contagiados a los pacientes en los que se manifestó la enfermedad en forma MDR⁵³, de allí la explicación de la igualdad de genotipos, poseyendo diferentes fenotipos⁵⁴. Un caso que dejo para la investigación es el estudio de la secuencia de las resistencias de un paciente a otro en el Perú, dado que por la concentración bacteriana necesaria en una cepa sensible para convertirse en MDR esporádicamente, es muy alta, por lo que el mecanismo involucraría primeramente la aparición de la resistencia al azar de un fármaco en una bacteria, como por ejemplo INH, la cual pasa a otro individuo, en el cual se sumaría otro tipo de resistencia, como lo podría ser a RIF, pero necesitando una menor concentración bacteriana que la establecida (Bastian and Portaels, 2006).

6.3 Estudio Bioinformático y discusión sobre la técnica de genotipaje utilizado

Los diferentes criterios de estudio, en relación a la epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis*, se deben a la complejidad del genoma de esta bacteria, de la cual recién en 1998 se pudo decodificar (Cole et.al., 1998), y aún así la gran mayoría de mecanismos moleculares y celulares que le pertenece no están totalmente explicados y no hay ni siquiera indicios de encontrar un locus que indique fehacientemente un patrón evolutivo en esta especie, aunque para el caso del tema principal era un problema, se comenzaron a tomar otras ideas, por lo que se halló una solución para esto, el cual era la de tomar en cuenta una de las características principales de esta bacteria, que era la de poseer una alta cantidad de secuencias repetitivas. Se clasificaron estas secuencias y se los ubicaron dentro del genoma para luego usarlos dentro de diferentes técnicas, comenzando por el método de RFLP creado por van Soolingen y van Embden en 1994, basado en la secuencia de inserción IS6110 y el Spoligotyping de Kamerbeec en 1997 basado en las secuencias DR, y junto a estas investigaciones se crearon también

⁵³ Una situación que se puede agregar es la posibilidad de selección de cepas drogoresistentes, al retomar su tratamiento el paciente enfermo.

⁵⁴ En un cultivo bacteriano las cepas de *M. tuberculosis* sensible a los fármacos con presencia de mutantes va a mantener su fenotipo sensible, dado la pequeña proporción de estos mutantes.

las metodologías de tipificación por PCR como el Mixed Linker PCR de Haas en 1993, el DRE-PCR de Friedman en 1995 y el IS6110 PCR inverse de Ota de 1997, entre otros.

De todas las técnicas, el método de RFLP-IS6110 es considerada en la actualidad como la única a ser llamada “Gold Standard”. Siendo base fundamental de la técnica de RFLP creada por la van Soolingen la secuencia de inserción IS6110, la cual fue descubierta por Thierry en 1990 dentro del genoma de *M. tuberculosis* (Thierry *et. al.*, 1990), cuya característica fundamental de esta secuencia la posibilidad de existencia de una gran variabilidad de copias de IS6110 entre una cepa a otra (registrándose de 1 a 20 copias⁵⁵), los cuales pueden estar en diferentes posiciones dentro del genoma (van Soolingen *et. al.*, 1994; Kremer *et. al.* 1999), logrando de esta manera la visualización de polimorfismos entre distintas cepas con una alta resolución⁵⁶, lo cual no podían hacer las otras metodologías.

En otro sentido las metodologías basadas en PCR eran técnicas alternativas que buscaban alcanzar o superar la resolución lograda por la técnica de RFLP-IS6110, pero que en sus comienzos no tuvieron éxito.

La técnica usada en este estudio analiza tres tipos de polimorfismos cuya lectura se basa: En las distancias entre las secuencias de inserción IS6110 -al igual que la metodología propuesta por Plykaitis *et. al.*, 1993-, entre las secuencias Mtb2 -la cual se encuentra en su mayoría de veces dentro de la familia genética PE PGRS y de las que se hallan entre las secuencias IS6110 y Mtb2. La metodología de PCR posee una diferencia con la de Prod’hom *et. al.*, 1997 el cual uso la secuencia de inserción en combinación con las secuencias DR.

Realizando comparaciones entre las secuencias Mtb2 y DR, las primeras poseen un valor epidemiológico superior a las segundas las cuales solo son secuencias repetitivas que se ubican en un único locus cromosomal sin ninguna función específica. Además es

⁵⁵ Se ha registrado también la ausencia de esta secuencia en algunos casos estudiados (Díaz, 2003)

⁵⁶ Es en referencia al número de bandas obtenidos por esta técnica que a comparación de otras, genera un número de bandas que permite una buena clasificación de polimorfismos (Comunicación personal con Díaz, 15 de Abril del 2008)

muy probable que las secuencias Mtb2 también posea una mejor resolución polimórfica, como se demuestra y analiza a continuación:

El primer Mtb2 (5'-CGGCGGCAACGGCGGC-3'), cabe repetir, se localiza en su mayoría, dentro de las secuencias de la familia de genes PE subfamilia PGRS, cuya función es desconocida (Delogu *et. al.*, 2004), más se halla relacionadas con la función de inmunopatogenicidad de las regiones de agrupación genética ESAT-6 (esax). Es una de las mayores fuentes de polimorfismos dentro del genoma de *M. tuberculosis*, mostrando además una remarcable homogeneidad genética y muy pocos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) (Sreevatsan *et al.*, 1997). Es una región altamente rica en secuencias GC (Aproximadamente el 80% de toda la secuencia), conteniendo repeticiones de 9pb CGGCGGCAA organizados en tandem (Poulet and Cole, 1995)⁵⁷. Esto ha llevado a especular que estas repeticiones están implicadas en los cambios genéticos que sufren esta secuencia durante la replicación y lo cual es reflejado en las variaciones fenotípicas que incluyen su variabilidad antigénica y en el tamaño de la proteína (Robertson and Meyer, 1992), evento que también ocurre en la superficie celular de los estreptococos, cuyo resultado es la evasión de la bacteria al sistema inmune (Hollingshead *et al.*, 1987)⁵⁸. Estos tipos de variaciones fenotípicas se observan mayormente en casos clínicos (Banu *et. al.*, 2002); En la genómica comparativa se observa que las variaciones entre las cepas H37Rv y CDC1551 subrayan el rol de los eventos de inserción-delección para la generación de la diversidad de las familias PE-PGRS. Dentro de la búsqueda de evadir al sistema inmune del hospedero, las bacterias mutan en demasía generando variaciones raras. Algunas de estas variaciones han sido conferidas a las polimerasas IV y V, conocidas como mutasas, estas participan en procesos microbianos cuyos blancos son los “genes de contingencia” los cuales siempre son los codificadores de los antígenos superficiales reconocidos por el sistema inmune (Moxon and Wills, 1999; Radman, 1999), este hecho además de la información de que los sitios blancos de estas polimerasas son secuencias repetitivas, conllevan a pensar que ambas enzimas generarían la variabilidad vista en *M. tuberculosis* en relación con los PE-PGRS.

⁵⁷ Cabe señalar que esta secuencia de 9pb se halla al inicio de la secuencia Mtb2.

⁵⁸ En el caso de los Estreptococos se nombran los eventos de delección o duplicación, en el caso de *M. tuberculosis* se nombra el evento de inserción-delección.

Es conocido que uno de los miembros de los PE-PGRS, Rv1759c, es una proteína de unión a fibronectina de 55 KDa, y es producida durante la infección y el proceso de la enfermedad, más no dentro de un ambiente de cultivo bacteriano (Abou-Zeid *et. al.*, 1991; Espitia *et. al.*, 1999). Dado su similaridad a los antígenos nucleares del virus Epstein-Barr en cuanto a la riqueza de Glicina y Alanina, se ha propuesto que las proteínas producidas por los genes PE-PGRS podrían actuar como inhibidores proteosomáticos, bloqueando el proceso de presentación del antígeno en el complejo de histocompatibilidad I (Levitskaya *et al.*, 1995; 1997; Cole, *et al.*, 1998). Las metodologías con gentotipificación con PGRS fueron inicialmente descritas por Ross *et. al.*, 1992 en una técnica basada en la hibridización por Southern Blot para estas secuencias.

Dentro del estudio se realizó una simulación de la técnica usando herramientas de la bioinformática. En la primera simulación, como se observa en la figura 10, se muestra la representación teórica de los resultados del genoma de la cepa H37Rv (Instituto Sanger) y la visualización de los productos de la técnica de PCR sobre la cepa H37Rv (Instituto Pasteur) utilizada en el estudio.

Se demuestra que varios de los productos “teóricos” se repiten en el estadio práctico y otros no; siendo estas pérdidas relacionadas con las secuencias Mtb2, del cual se infiere que son consecuencia de transposiciones de las secuencias repetitivas, de una delección espontánea o producida por la inserción de una secuencia (Belkum *et. al.*, 1998; Fang *et. al.*, 1998).

De igual manera, se observó que existía una secuencia inespecífica de 300pb producto de los primers IS1 e IS2. Su origen posiblemente sea por consecuencia de la transposición de fragmentos de una secuencia IS6110 (o la secuencia entera) a la distancia antes referida una de la otra (Fang *et. al.*, 1998; Mahillon *et. al.*, 1998), o también de una transposición y luego duplicación como lo mencionara Fang *et. al.*, 1999 (Figura 5), dudo de la posibilidad de una doble transposición, dado que no poseo referencias de ello y porque es menos probable que este evento ocurra en comparación de los anteriormente mencionados.

En un segundo término se realizó un patrón comparativo para el estudio realizado, evaluando los genomas **KZN 605**, **KZN 1435** y **KZN 4207**⁵⁹, junto con los resultados obtenidos del genoma H37Rv (Instituto Sanger) y el resultado práctico de la técnica sobre la cepa H37Rv (Instituto Pasteur). Como se observa en la figura 11 los patrones polimórficos son distintos en todos los casos, en especial entre los KZN y los H37Rv.

Una particularidad de estos resultados es el posible movimiento de las secuencias de inserción y la desaparición de secuencias Mtb2, como lo demuestran las apariciones y desapariciones de los productos de amplificación relacionados con ellos, un tema discutido anteriormente.

Otra observación que se mencionara de forma adelantada al tema, es que la presencia del producto de amplificación que en “común” de 862 pb o 840 pb poseen los KZN con las H37Rv, dentro del estudio de los perfiles genotípicos obtenidos, solo se hallaron dos cepas que tenían este detalle, a pesar de que la repetitividad cercana de las secuencias Mtb2 es común en *Mycobacterium tuberculosis*.

En un tercer término se realizaron dendogramas de los perfiles genotípicos, teniendo como variable la ausencia o presencia de los productos, de los que cabe observar el “relativo” alto índice de similaridad entre la cepa KZN1435 y la cepa KZN 4207, una cepa sensible y otra resistente respectivamente, un patrón que se repite de una manera más radical en el dendograma obtenido en el estudio, en el que se puede observar similaridades del 100% entre cepas sensibles y cepas resistentes.

En el mismo sentido, se realizó un estudio comparativo de los genomas estudiados bajo la herramienta bioinformática Mauve 2.0 (Figura 9 y 10), cuyos motivos fueron dos: El primero, comprobar la pérdida de similaridad entre las cepas relacionadas con la drogorresistencia con una cepa patrón que no presenta mutaciones de este tipo, objetivo que se logró dado que no solo se puede observar la pérdida de similaridad de fragmentos genéticos de secuencias de inserción y otros tipos de secuencias repetitivas

⁵⁹ Las secuencias KZN representan los fenotipos más importantes de drogorresistencia existentes hoy en día, en especial en los países con altos índices para este carácter, como lo es nuestro país. El lugar donde fueron aisladas estas cepas fue una de las primeras ciudades donde se reportó la presencia de cepas de *M. tuberculosis* XDR, específicamente en pacientes coinfectados con VIH y tuberculosis (Gandhi *et. al.* 2006).

en las cepas drogoresistentes, si no además que se observan perdidas de similitud entre secuencias implicadas en la resistencia a drogas. Este último caso incide en la discusión posterior que se va a realizar dado que existen hipótesis sobre este hecho conferidos a la evolución de *M. tuberculosis* (Kato Maeda *et. al.*, 2001; Martiel y Blot, 2002; Gagneux *et. al.* 2006). Y El segundo fue obtener un dendograma de similitud de los genomas, el cual coincidió con los resultados anteriormente citados, por lo que se comprueba la veracidad de la técnica.

6.4 Notas Finales

Las causas que han conllevado a las consecuencias mostradas para la tuberculosis en el Perú, devienen desde el inicio de la historia de los sistemas terapéuticos para el control de la tuberculosis (Perú, 2006), como fue mencionado al inicio de esta tesis.

El Sistema DOTS en el Perú presenta inefficiencias dado que, como se menciono anteriormente, muchos de los pacientes no sigue su terapia o tiene un inadecuado régimen de tratamiento. El problema radica en que un esquema de tratamiento “directamente observado” es muy difícil de seguir en el país para la gran mayoría de los casos, dado que se sigue una terapia de control externo en el paciente, cuya hospitalización solo es en casos de complicaciones de la enfermedad. Siendo una de las mayores dificultades la aplicación del esquema DOTS en la terapia, la cual consiste en la administración de los antibióticos al paciente supervisado por una persona capacitada y responsable para ello, lo cual implica que si el paciente no llega al nosocomio en el que lleva el tratamiento, el agente de salud debe realizar un seguimiento del paciente hasta su centro laboral o de estudios, si no es en el caso que se halle en su domicilio. Esta situación se dificulta cuando las entidades no apoyan a los agentes o el paciente oculta su enfermedad dentro de su institución. Además se añade el hecho de que no existen muchos agentes para realizar estas acciones dentro de nuestro país.

En otros países como Brasil, la estrategia planteada por la WHO para la lucha contra la tuberculosis DOTS ha sido modificada en torno a los motivos de hospitalización del enfermo, en los cuales añade los casos en que se presente Meningocefalitis, complicaciones en el tratamiento, intolerancia hacia las drogas suministradas, aplicación de una intervención quirúrgica, o si el paciente no puede seguir el tratamiento

ambulatorio por razones generales o por la falta de un domicilio. Mantienen atenciones especiales a personas que denominan de alto riesgo: infectados con VIH, personas mayores de 60 años, con patologías hepáticas, que usan anticonvulsivos, alcohólicos, y los que posean un mal estado en general. Los casos MDR son administrados por un ente individualizado (Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária e Centro de Referência Professor Hélio Fraga) el cual esta responsabilizado de su diagnóstico y tratamiento y en los casos de complicación de la enfermedad en estos pacientes, existen hospitales especializados para estos casos (Brasil, 2002). Actualmente el mismo gobierno central ha tomado un rol protagónico en torno a la lucha contra la tuberculosis en Brasil, que ha brindado sus frutos dado que habiendo tenido una tasa de morbilidad de 193 x 100, 000 habitantes en 1996 (Gehard *et. al.*, 2002) en el año 2005 esta tasa disminuyó hasta 60 x 100, 000 habitantes (Brasil, 2002).

Chile es uno de los casos que mejor historial de tratamiento contra la tuberculosis. Desde la década de 1950 practican la quimioterapia específica para enfermos con TB y la vacunación con BCG en recién nacidos y escolares, mantuvo un descenso de morbilidad en los años sesenta, y fue uno de los primeros países en implementar la estrategia de tratamiento DOTS en la década de 1970. Poseen un programa de control estructurado en diferentes áreas con labores diferentes, incentivan las labores de investigación epidemiológica, control y evaluación del sistema. También existen centros de salud especializados para los enfermos que presentan complicaciones y los que presentan casos de TB MDR. Su más alta tasa de morbilidad fue de 39,9 x 100, 000 habitantes en 1981, teniendo en el año 2003 una tasa de 8,1 x 100, 000 habitantes (Ministerio de Salud de Chile, 2005).

Con estas líneas se quiere resaltar que nuestro sistema no debería conformarse con resultados efímeros que poco demuestran la realidad de la tuberculosis en el Perú y más bien debería preocuparse de subsanar errores pasados que no se pueden observar si no es mediante investigaciones eficientes que evoquen buenas discusiones y conclusiones.

Quisieramos culminar desarrollando un esquema de las formas de contagio e infección de TB en el Perú. En la figura 20 se representa las diferentes vías de infección intrahospitalaria con *M. tuberculosis* en el Perú registradas en las historias clínicas revisadas para el presente estudio y de referencias bibliográficas. Los bultos del

esquema representan a las personas con riesgo de infección y los cuadrados dentro de ellos es la cepa de *M. tuberculosis* del cual esta infectada. La ruta “A”, refiere a los casos de las infecciones por contagio de tuberculosis de un paciente a otro, independientemente con la aparición de un brote, la persistencia de la infección, sumado a un fracaso terapéutico al tratamiento antituberculoso en un paciente, origina cambios en los genomas de la cepa del cual esta infectado lo que se representa con los diferentes colores entre una y otra cepa. Otras vías alternas de infección son las que se muestran en las demás rutas⁶⁰, en la ruta “B”, se observa el caso de la muestra del paciente “A”, la cual es llevada con fines de diagnóstico al laboratorio, el riesgo de contagio en este caso reside en la continua exposición del personal de laboratorio a las muestras de pacientes enfermos con TB y/o de las cepas cultivadas de los mismos, razón por el cual ellos a su vez pueden infectar a otras personas, los que pueden ser sus pacientes y/o familiares (WHO^b, 2006). La ruta “C” refiere al caso explicado anteriormente en relación al brote ocurrido en el hospital Almenara, siendo las siguientes algunas de las razones de este suceso: i) La exposición prolongada entre el paciente enfermo de TB y el trabajador de salud, ii) Periodos tardíos de diagnóstico de infección por *M. tuberculosis* del personal de salud enfermo y iii) El contacto directo entre el trabajador de salud enfermo de TB con el sano en ambientes muy reducidos y con poca ventilación (Alonso-Echanove *et. al.*, 2001), se añade a estos casos la probabilidad de riesgo de contagio entre un trabajador de salud enfermo de tuberculosis y un paciente del hospital que posea otra enfermedad, siendo los pacientes VIH+ los que poseen un mayor riesgo (Joshi *et. al.*, 2006). La ruta “D”, esquematiza el riesgo de contagio del personal no profesional que entra en contacto con material infectado con *M. tuberculosis* o del personal que se encarga de las necropsias de un fallecido por la enfermedad de la tuberculosis, en ambos casos la bacteria “esta oculta” y no debería de interactuar en un proceso de infección, por lo que se representa como lo muestra el pequeño gráfico (Joshi *et. al.*, 2006). La ruta “E” es un caso hipotético de coinfección de dos cepas diferentes de *M. tuberculosis* nombrado por Small *et. al.*, 1993 y Niemann *et. al.*, 2000, y del cual se sospecha que ocurre en el paciente codificado como MT034, por los resultados del genotipaje para su cepa el cual parece ser un caso de superposición de perfiles genotípicos, y por los antecedentes clínicos que presenta. Esta paciente es del sexo femenino mayor de 30 años, Madre soltera, tiene antecedentes familiares de la enfermedad: Hace 34 años

⁶⁰ Se refieren a los casos intrahospitalarios

falleció un hermano suyo por TB, y hace 5 años falleció una hija suya por TB MDR, contagiada por ella misma. Es catalogada como de alto riesgo al padecer de Diabetes Mielitus, mal que padecen 4 hermanos suyos. Desde el inicio padeció de TB MDR, lleva 11 años de tratamiento (1995-2008) y ha fracasado al tratamiento con esquema DOS e individualizado para MDR. Presenta resistencia a INH, RIF y PZA desde el inicio de su enfermedad hasta el 20 de enero del 2005, en septiembre del mismo año llega a presentar además resistencia a SM. En Enero del 2003 presenta complicaciones al tener un edema de cara y es llevada a hospitalizarse. Su último registro es en mayo del 2007, presentando aún cultivos positivos para TB, el cual fue tomado en esta investigación.

Finalmente, se observa que en el Perú no solo asistimos a un proceso de drogoresistencia generado en un solo paciente (“*within-host*”), sino que observamos que estas cepas interactúan con otros huéspedes (“*betwen-host*”) dentro de un mismo proceso de evolución hacia una cepa drogoresistente con un fitness suficiente para permanecer en diferentes medios⁶¹.

En relación a las interacciones entre huéspedes (“*between host*”) el esquema es el siguiente, un paciente que posee una cepa sensible contagia a otra persona con bacterias resistente a un antibiótico como lo puede ser INH como se explico anteriormente, luego del cual este último contagia a otra persona en la cual se genera además de la resistencia a INH, la resistencia a RIF formándose un MDR.

⁶¹ Hay referencias que constatan que las interacciones entre pacientes (*between host*) dentro de un proceso patogénico es normalmente común y altamente estable, el problema radica cuando ocurren los procesos dentro de un solo paciente (*within host*) y entre pacientes (*between host*) al mismo tiempo en una población.

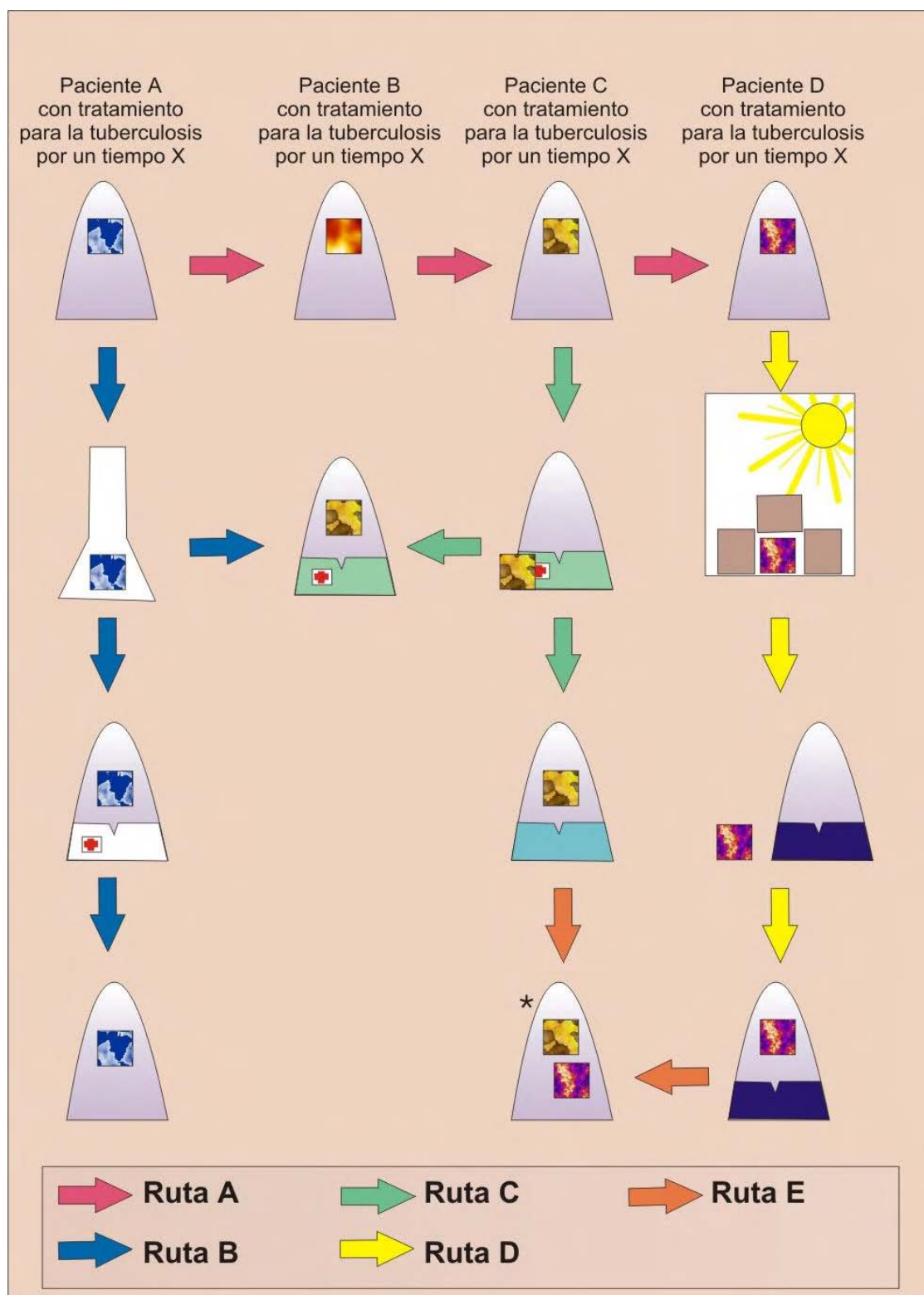


Figura 20. Esquema teórico de los mecanismos de contagio de tuberculosis en el Perú. Cada bulto indica una persona, los cuadrados dentro de ellas las cepas de *M. tuberculosis* que han adquirido. El bulto con vestido verde es un trabajador de salud, el de vestido blanco es un médico, el de vestido celeste es un paciente de cuidados intensivos, el de vestido azul un trabajador de limpieza. El caso en asterisco es especial, referido a las investigaciones de Small *et. al.*, 1993 y Niemann *et. al.*, 2000.

Esta cepa MDR a su vez puede ser contagiada a otro individuo de cuyos antecedentes de la enfermedad se desconoce, por lo que su diagnóstico para la determinación en MDR es tardío por la complejidad del procesamiento de la bacteria en los exámenes de sensibilidad de los laboratorios, además que es llevado a un tratamiento en el que tiene altas probabilidades de fracaso, en este caso el paciente puede comenzar a generar la XDR.

En el caso de las interacciones dentro de un huésped (“*within host*”), es cuando un paciente que posee una cepa sensible a los antibióticos genera por sí mismo la MDR, producto de una mala terapia. Existe un caso especial en relación a los indígenas de la sierra del Perú, al adquirir la bacteria de *M. tuberculosis*, lo mantienen dentro de su organismo, más no manifiestan la enfermedad.

Estas interacciones dentro de un huésped o entre ellos, generan otro tipo de presión selectiva en la bacteria en relación a los diferentes medios en el que debe adaptarse la bacteria (Cole and Eisenach., 2005), y más aún cuando estas interacciones suceden en gran número como lo evidencian todos los datos mostrados.

Estos hechos apoyan más la tendencia selectiva que ocurre en el Perú con respecto a las infecciones con *M. tuberculosis* y del proceso de evolución en el que asistimos, cuyo fin es incierto y preocupante a la vez.

Las mutaciones para las secuencias de inserción no son al azar y siempre se dirigen a sitios específicos, esta bacteria como cualquier ser viviente no varía las posiciones de sus secuencias de inserción sin un fin específico, y la incoherencia es tan solo un caos aparente que oculta un orden evolutivo hacia un fin.

La razón por la que no se ha afirmado esto anteriormente es que durante mucho tiempo se ha buscado un indicador específico de una evolución como los *housekeeping*, con la idea de hallar un patrón genético que indique cambios definidos y fácilmente caracterizados y relacionados con este tipo de mutaciones, más con la información citada, *M. tuberculosis* posee un genoma demasiado voluble y cambiante, del cual hasta ahora no se ha podido descifrar por completo, y solo vemos movimientos que son aparentemente incoherentes y no tienen una razón.

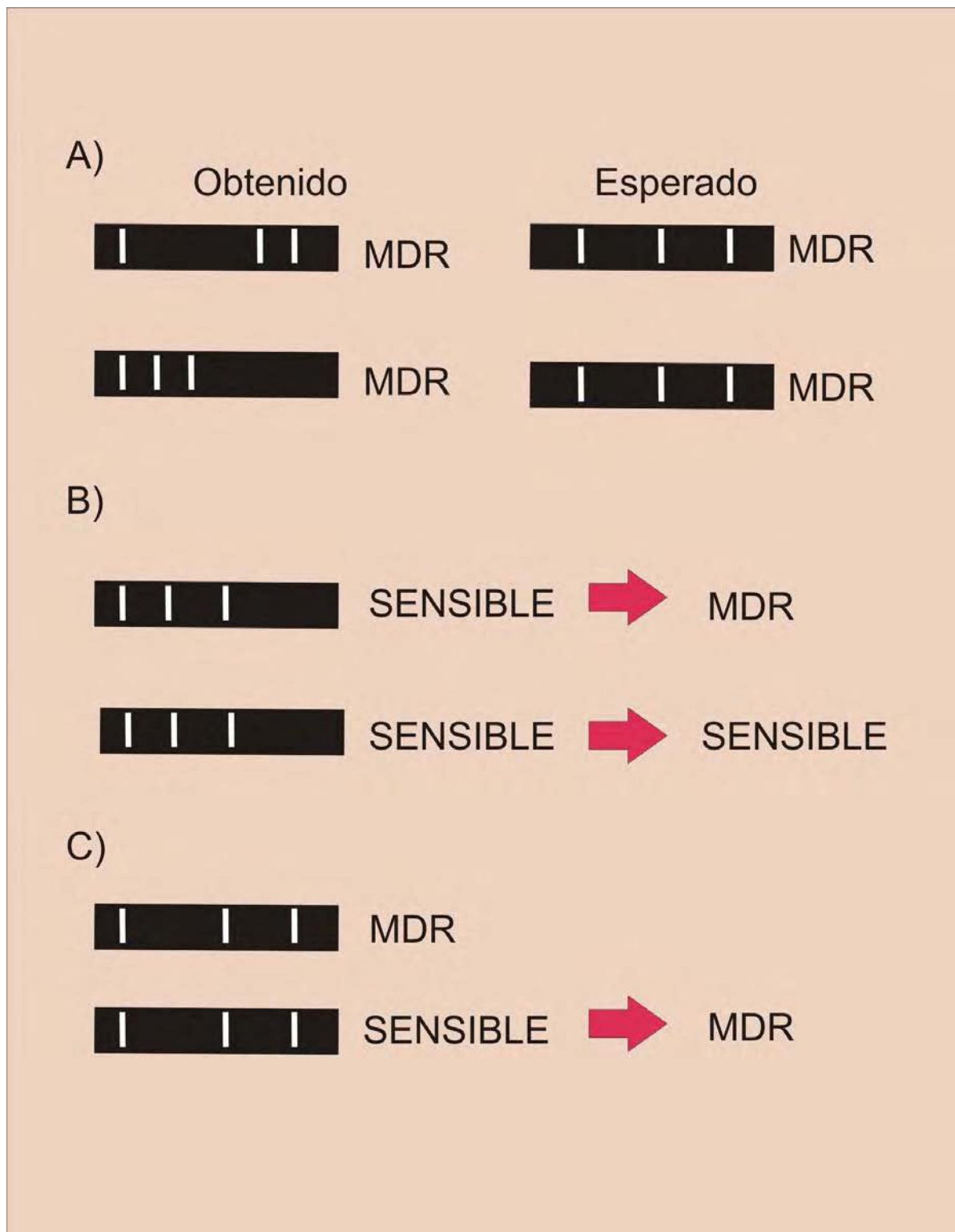


Figura 21. Esquemas referidos en la discusión de igualdad entre cepas sensibles y cepas MDR. **A.** Refiere a la primera teoría citada en el que se espera igualdad de genotipos entre cepas sensibles y MDR. **B.** Es la teoría que se defiende en la manifestación de dos fenotipos diferentes con un mismo fenotipo. **C.** Referencia a la posible teoría de la tendencia de una cepa sensible a ser MDR.

Se debe acotar de que lo que se muestra en esta tesis solo son indicadores de un gran proceso que aún no ha sido descifrado. En el que intervienen muchos mecanismos (Rattan *et. al.*, 1998; Fang *et. al.*, 1998; Brosh *et. al.*, 2002; Dos Vultos, 2008) y de los que la gran mayoría no han sido todavía ni descubiertos ni descifrados.

Nada nos hubiera costado tan solo anunciar que por la mera presencia de cepas MDR, MDR asociadas a resistencia a drogas de segunda línea y XDR, el sistema de tratamiento en el Perú es negligente (Van Rie *et. al.*, 2006; Raviglione *et. al.*, 2006). Pero con este trabajo se desea manifestar la verdadera magnitud de la gravedad del estado de las infecciones con tuberculosis en el Perú.

7. Conclusiones

7. Conclusiones

- Existe una gran población afectadas por cepas MDR en las provincias de Lima y Callao, lo cual podría ser el reflejo de la realidad epidemiológica del Perú. Sin embargo, Lima es la que concentra la mayor población de enfermos con TB, presentando cepas sensibles, resistentes, MDR y MDR plus.
- Existen altos niveles de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a Rifampicina, Isoniacida y Estreptomina, los cuales son indicadores del riesgo latente de las Multidrogorresistencias dentro de la población.
- La técnica de genotipaje basado en PCR usada en el presente estudio posee una alta repetitividad y una alta resolución para la observación de un gran número de polimorfismos dentro de una población bacteriana de *M. tuberculosis*, por lo que es adecuada para realizar estudios epidemiológicos.
- Los estudios bioinformáticos constatan la utilidad de esta técnica en el seguimiento de una cepa durante un proceso de mutación relacionado con las secuencias de inserción y/o las secuencias de la familia de genes PGRS, como se observó al estudiar la integridad del genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv que se utilizó como control.
- Los estudios de los genomas de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, KZN 605, KZN 1435 y KZN 4207, y la elaboración de un dendograma por bioinformática, comprueban la alta capacidad de esta técnica en estudios epidemiológicos en la que intervienen cepas con algún tipo de resistencia.
- Existe una baja clonalidad y un alto número de polimorfismos genotípicos en las cepas, por cual no se puede definir un perfil genotípico particular en relación a las drogoresistencias, este hecho es corroborado con resultados de otras investigaciones.
- Las colonias bacterianas de *M. tuberculosis* estudiadas, han estado circulando en las áreas de Lima y Callao durante más de 20 años, siendo factor de la aparición de las

especies de *M. tuberculosis* XDR, hecho que se sustenta con la investigación realizada.

- Existen cepas sensibles a las drogas antituberculosas que poseen igual genotipo que las cepas resistentes, lo cual es resultado de un tratamiento discontinuo que conllevaría al aumento de manera exponencial de las bacterias, y a la aparición por el azar las cepas MDR o XDR, que luego son contagiadas a otra persona.
- La población masculina presentan un mayor riesgo de contagio por TB encontrándose dentro del rango de edad productiva (PEA), siendo la población de mayor riesgo de los menores de 30 años.
- Los pacientes que tienen la asociación VIH/TB, son una población minoritaria y poseen el mayor riesgo de contagio, en la muestra poblacional estudiada.
- Según el análisis de riesgo tienen el mismo riesgo los pacientes con antecedentes de haber contraído TB y aquellos sin antecedentes.
- La presencia de cepas drogoresistentes, MDR, MDR plus y XDR, añadido al hecho de encontrar cepas producto de errores pasados del sistema (como la permanencia de cepas de más de 20 años) y de la presencia de errores actuales (como es la presencia de cepas sensibles con igual genotipo con las drogoresistentes), basado en estos hechos y por opinión de otros expertos de diferentes países, nosotros concluimos que nuestro sistema de salud frente a la tuberculosis es ineficiente y negligente, por no prevenir, ni estudiar, ni vigilar, ni controlar el avance de todos estos sucesos.

8. Recomendaciones

8. Recomendaciones.

- Se recomienda continuar los estudios **epidemiológicos moleculares** sobre TB, como una herramienta de vigilancia dentro de nuestra población.
- La población escogida dentro de los estudios epidemiológicos generales en TB deberían tomarse dentro de una muestra que abarquen hospitales de todos los sistemas de salud del Perú (MINSA, ESSALUD y Fuerzas Armadas), lo cual es ideal en este tipo de investigaciones.
- El estudio epidemiológico molecular de las drogoresistencias, seria complementado en una población de mayor número.
- El análisis y la discusión de los métodos moleculares de tipificación, siempre deben de complementarse con los datos epidemiológicos de cada uno de los pacientes estudiados.
- Dentro del estudio de los riesgos relacionado con los dendogramas producidos en base de patrones genéticos, es recomendable solo usar agrupaciones con similitudes iguales o mayores al 80%, como medida estándar.
- En el proceso de PCR se recomienda estandarizarlo con el DNA de la cepa H37Rv.
- El DNA obtenido de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* es lo mas recomendable en este tipo de estudios.

9. Referencias Bibliográficas

9. Referencias Bibliográficas

Aaron C., Bob M., Frederick R., and Nicole T. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*. **14**: 1394-1403.

Abou-Zeid C., Garbe T., Lathigra R., Wiker H. G., Harboe M., Rook G. A.W., Young D. B. 1991. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect. Immun.* **59**: 2712-2718.

Agencia de Cooperación Internacional de Japón (Jica), Consejo de Transporte de Lima y Callao, Ministerio de Transportes y Comunicaciones de la República del Perú. 2005. Plan Maestro de Transporte Urbano para el Área Metropolitana de Lima y Callao en la República del Perú (Fase 1). Informe Final. Yachiyo Engineering Co., Ltd en asociación con Pacific Consultants International. Vol. 1: Parte 2.

Alito A., Morcillo N., Scipioni S., Dolmann A., Romano M. I., Cataldi A., van Soolingen D. 1999. The IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism in Particular Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Evolve Too Fast for Reliable Use in Outbreak Investigation. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 788-791.

Alonso-Echanove J., Granich RM, Laszlo A, Chu G., Borja N., Blas R., Olortegui A., Binkin N. J., Jarvis W. R. 2001. Occupational transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to health care workers in a university hospital in Lima, Peru. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 589-596.

Asencios L., Sanabria H., Díaz S., Vásquez L., Quispe N. 1996. Resistencia primaria del *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos antituberculosos en el Perú (1993 – 1994). *Rev Peru Epidemiol.* **9**: 40-4.

Badiola R. 1997. 'Apuntes sobre el Papiro Ebers'. *BAEDE* N° 7. 43-75.

Baldeviano C, Quispe N, Bonilla C, Gastiaburu D, Pro J, Llanos-Zavalaga L F. 2003. Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del Callao, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* **20**: 72-77.

Banerjee A., Dubnau E., Quemard A., Balasubramanian V., Um K. S., Wilson T., Collins D., de Lisle G., Jacobs Jr. W. R. 1994. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **263**: 227-230.

Banu S., Honoré N., Saint-Joanis B., Philpott D., Prévost M.-C. Cole S. T. 2002. Are the PE-GRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol. Microbiol.* **52**: 725-733.

Bastian I. Portaels F. Multidrug-Resistant Tuberculosis. First Edition. Dordrecht, The Netherlands. Ed. Kluwer Academic Publishers, 2000.

BBC World Service. 2001. Momias con tuberculosis. *Ciencia*. [Online.] Noviembre de 2001. http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_1681000/1681804.stm.

Belanger A. E., Besra G. S., Ford M. E., Mikusova K., Belisle J. T., Brennan P. J., Inamine J. M. 1996. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 11919-11924.

Benz R. 2008. Study of the cell wall channels of the mycolata and other actinomycetes. Proyect of Julius-Maximilians Universität. [Online.] <http://wbtd57.biozentrum.uni-wuerzburg.de/forschung/Arbeitsgebiete/arbeitsgebiete.php?page=5be>

- Bergler H., Wallner P., Ebeling A., Leitinger B., Fuchshlschler S., Aschauer H., Kollenzll G., Hogenauert G., Turnowsky F.** 1994. Protein EnvM is the NADH-dependent-enoyl-ACP-reductase (FabI) of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **269**: 5493-5496.
- Bloom B. R.** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. NW, Washington. USA. American Society for Microbiology, 1994.
- Blot, M.** 1994. Transposable elements and adaptation of host bacteria. Genetica, **93**: 5–12.
- Brasil, Ministerio da Saúde, Fundação da Saude.** 2000. Tuberculose Guia de Vigilância Epidemiológica. 1ª edição elaborada pelo Comitê Técnico-Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para co-infecção HIV-Tuberculose e Colaboradores, Ministerio da Saúde - Brasília, DF.
- Brock T.** Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. NW, Washington. USA. American Society for Microbiology, 1999.
- Brosch R., Gordon S. V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L. M., Pym A. S., Samper S., van Soolingen D., Cole S. T.** 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS. **99**: 3684-3689.
- Campos P. E., Suárez P. G., Sanchez J., Zavala D., Arevalo J., Ticona E., Nolan C. M., Hooton T. M., Holmes K. K.** 2003. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-Infected Persons, Peru. Emerg. Infect. Dis. **12**: 1571-1578.
- Canetti G., Froman S., Grosset J., Hauduroy P., Langerova M., Mahler H. T., Meissner G., Mitchison D. A., Sula L.** 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull. World Health Organ. **29**: 565-578.
- Capcha L, Urbina M, Vásquez L, Asencios L, Quispe N, Leo E, Baldeviano C., Zavaleta Amparo.** 2005. Perfiles Genéticos (IS6110) y patrones de Resistencia en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con Tuberculosis Pulmonar. Lima Sur, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica **22**: 4-11.
- Cave M. D., Eisenach K. D., McDermott P. F., Bates J. H., Crawford J. T.** 1991. IS6110: Conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Mol. Cell. Probes. **5**: 73-80.
- Chae H. Z., Robinson K., Leslie B., Church G. B., Storz G., Rhee S. G.** 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain, alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific anti-oxidant define a large family of antioxidant enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**: 7017-7021.
- Chalmers R., and Blot M.** 1999. Insertion sequences and transposons. in “Organisation of the Prokaryotic Genome” (R. L. Charlebois, Ed.), pp. 151–169, ASM Press, New York.
- Chile, Ministerio de Salud, Subsecretaria de Salud Pública, División de Prevención y Control De Enfermedades** 2005. Programa Nacional De Control De La Tuberculosis Manual Año 2005. Editorial e Imprenta Maval.
- Choi J., Jung H., Kim H., Cho H.** 2000. PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. Bioinformatics. **16**: 1056-1058.
- Cole ST.** 1994. *Mycobacterium tuberculosis*: drug-resistance mechanisms. Trends. Microbiol. **2**: 411-415.

Cole S T, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C. E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M. A., Rajandream M. A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J. E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B. G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **393**: 537-544.

Cole S. T., Eisenach K.D. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. NW, Washington. USA. ASM Press American Society for Microbiology, 2005.

Cooper V. S., Schneider D., Blot M., Lenski R. E. 2001. Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* **183**: 2834–2841.

Coronado V. G., Beck-Sagué C. M., Hutton M. D., Davis B. J., Nicholas P., Villareal C., Woodley C. L., Kilburn J. O., Crawford J. T., Frieden T. R., Sinkowitz R. L., Jarvis W. R. 1993. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Infect. Dis.* **168**: 1052-1055.

David H. L. 1970. Probability Distribution of Drug-Resistant Mutants in Unselected Populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol.* **5**: 810-814.

Delogu G. Pusceddu C., Bua A., Fadda G., Brennan M. J., Zanetti S. 2004. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol. Microbiol.* **52**: 725–733.

Díaz Rodríguez, Raúl. 2003. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y su implicación en el control de la tuberculosis en Cuba. [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" Subdirección de Microbiología Departamento de bacteriología-micología.

Diccionario de Ciencias Médicas Dorland. Buenos aires, Argentina. Cuarta Edición castellana. Editorial El Ateneo. 1975. Tomo I. pp. 655.

Diccionario de la Real Lengua Española. Edición electrónica Espasa Calpe, S. A., 1995. Versión 21.1.0

Dos Vultos T., Mestre O., Rauzier J., Golec M., Rastogi N., Rasolofo V., Tonjum T., Sola C., Matic I., Gicquel B. 2008 Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*. **3**: e1538.

Douglass J, Steyn LM. 1993. A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.* **167**: 1505-1506.

Edlin B. R., Tokars J. I., Grieco M. H., Crawford J. T., Williams J., Sordillo E. M., Kenneth R., Kilburn J. O., Dooley S. W., Castro K. G., Jarvis W. R., Holmberg S. D. 1992. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Eng. J. Med.* **326**: 1514-1521.

El Comercio, Perú. 2008. La Victoria concentra el mayor número de casos de tuberculosis en el Perú. [Online.] <http://www.elcomercio.com.pe/ediciononline/HTML/2008-03-12/la-victoria-concentra-mayor-numero-casos-tuberculosis-peru.html>.

Enciclopædia Universal Ilustrada. Madrid, España. Ed. Espasa Calpe, 1921. Tomo XLIII. pp. 1438

- España, Sociedad Estatal para la acción cultural exterior.** 2004. Perú: Indígena y Virreinal. Ciclo de conferencias. [Online.] http://www.seacex.com/0202_exp.cfm?idExposicion=127.
- Espitia C., Lacleste J. P., Mondragon-Palomino M., Amador A., Campuzano J., Martens A., Singh M., Cicero R., Zhang Y., Moreno C.** 1999. The PEPGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiology*. **145**: 3487–3495.
- Fang Z., and Forbes K. J.** 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.* **35**:479-481.
- Fang Z., N. Morrison, Watt B., Doig C., Forbes K. J.** 1998. IS6110 Transposition and Evolutionary Scenario of the Direct Repeat Locus in a Group of Closely Related *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *J. Bacteriol.* **180**: 2102–2109.
- Fang Z., Doig C., Kenna D. T., Smittipat N., Palittapongarnpim P., Watt B., Forbes K. J.** 1999. IS6110-mediated deletions of wild-type chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **181**:1014-1020.
- Finken M., Kirschner P., Meier A., Wrede A., Bottger E. C.** 1993. Molecular basis of streptomycin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alteration of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S rRNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* **9**: 1239-46.
- Foschiani I, Cardoso M, Araújo D, Suffys P.** 2002. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virusinfected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **97**:1147-1152.
- Friedman C.R., Stoeckle M.Y., Johnson-W.D. J., Riley L.W.** 1995. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1383-4.
- Frothingham R., Meeker-O'Connell W. A.** 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. **144**: 1189-1196.
- Gagneux S., Long C. D., Small P. M., Van T., Schoolnik G. K., Bohannan B. J.** 2006. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **312**: 1944-1946.
- Gandhi N. R., Moll A., Sturm A. W., Pawinski R., Govender T., Lalloo U., Zeller K., Andrews J., Friedland G.** 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*. **368**:1575–80.
- Garrett D. O., Dooley D. S., Snider D. E. Jr, Jarvis W. R.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mayhall CG, ed. Hospital epidemiology and infection control. 2d ed. Philadelphia: Lippincott: 477–503.
- Gerhardt G., Teixeira G. M., Diniz L. S.** 2002. O Controle da Tuberculose em área do Distrito de Campos Eliseos de Duque de Caxias – RJ. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. **10**:13-20.
- Goldman R. C., Plumley K. V., Laughon B. E.** 2007. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. *Infect Disord Drug Targets*. **7**: 73-91.
- Granich R., Chauhan L. S.** 2003. Status report of the Revised National Tuberculosis Control Programme: January 2003. *J. Indian. Med. Assoc.* **101**:150-151, 156.
- Haas W. H., Butler W. R., Woodley C. L., Crawford J. T.** 1993. Mixed-Linker Polymerase Chain Reaction: a New Method for Rapid Fingerprinting of Isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1293-1298.

- Haas F., Haas S. S.** The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. In: Rom WN, Garay SM, editors. *Tuberculosis*. Boston, MA: Little, Brown and Company, 1996. pp 3-19.
- Herodoto de Halicarnaso.** Los Nueve Libros de la Historia. Trad. Padre Bartolomé Poú (1727-1802). 1.^a edición, 7.^a impresión. Madrid. 2004. pp. 75
- Herzog H.** 1998. History of tuberculosis. *Respiration*. **65**: 5-15.
- Heym B., Alzavi P. M., Honore N., Cole S. T.** 1995. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **15**: 235-245.
- Hollingshead S.K., Fischetti V.A., Scott J.R.** 1987. Size variation in group A streptococcal M protein is generated by homologous recombination between intragenic repeats. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 196-203.
- Hong X., Hopfinger A. J.** 2004. Construction, Molecular Modeling, and Simulation of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Walls. *Biomacromolecules*. **5**: 1052 -1065
- INEI.** 2007. Censos Nacionales 2007: XI de población y VI de vivienda. [Online.] <http://www1.inei.gob.pe/inicio.htm>.
- INEI.** Cuadro N° 5: Perú: Población Económicamente Activa Total, 1970-2015. [Online.] <http://www.inei.gob.pe/biblioineipub/bancopub/Est/Lib0176/N339/ANEXO005.htm>
- Iseman M. D., Madsen L. A.** 1989. Drug-resistant tuberculosis. *Clin. Chest. Med.* **10**: 341-353.
- Iseman M. D.** 2007. Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Charles Darwin Would Understand. *Clin. Infect. Dis.* **45**: 1415-1416.
- Ívens De Araújo M. E., Fandinho F. C. O., Werneck-Barreto A. M., Gonçalves-Veloso V., Grinstein B., Lourenço M. K., Werneck- Barroso E., Degraive W. M., Suffys P. N.** 1998. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with and without Aids in Rio de Janeiro. *Bras. J. Med. Biol. Res.* **31**: 369-372.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.** 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. **314**. 67-73.
- Joshi R., Reingold A. L., Menzies D., Pai M.** 2006. Tuberculosis among Health-Care Workers in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review. *Plos Med.* **3**: 2376-2391.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Van Agterveld M., Van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Van Embden J.** 1997. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 907-914.
- Kaufmann S. H., Schaible U. E.** 2005. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends. Microbiol.* **13**: 469-475.
- Kato-Maeda M., Rhee J. T., Gingeras T. R., Salamon H., Drenkow J., Smittipat N., Small P. M.** 2001. Comparing Genomes within the Species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome. Res.* **11**: 547-554.
- Kirchhausen T., Wang J. C., Harrison S. C.** 1985. DNA gyrase and its complexes with DNA: direct observation by electron microscopy. *Cell*. **41**: 933-943.

- Kotlowski, R., I. Chola Shamputa, N. Abdullah El Aila, A. Sajduda, L. Rigouts, A. van Deun, and F.Portaels.** 2004. PCR-based genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with new GC-rich repeated sequences and IS6110 inverted repeats used as primers. *J. Clin. Microbiol.* **42**:372-377.
- Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., Haas W. H., Hermans P. W., Martín C., Palittapongarnpim P., Plikaytis B. B., Riley L. W., Yakrus M. A., Musser J. M., van Embden J. D.** 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2607-2618.
- Kubín M., Havelkova M., Hyncicova I., Svecova Z., Kaustova J., Kremer K., Van Soolingen D.** 1999. A Multidrug-Resistant Tuberculosis Microepidemic Caused by Genetically Closely Related *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2715–2716.
- Lemus Molina, Dihadenys.** 2007. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Subdirección de Microbiología Departamento de bacteriología-micología.
- Leo E., Vásquez L., Asencios L., Quispe N., Gómez L., Lecca L., Llanos-Zavalaga F.** 2003. Determinación de la Susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a la pirazinamida mediante la prueba de la pirazinamidasa, Perú – 1999. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica.* **20**: 105-106.
- Levitskaya J., Coram, M. Levitsky, V. Imreh, S. Steigerwald, M.P. Klein, G., Kurilla M. G., Masucci M. G.** 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein–Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**: 685–688.
- Levitskaya J., Sharipo A., Leonchiks A., Ciechanover A., Masucci M.G.** 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome- dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein–Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 12616–12621.
- Lillebaek T., Andersen A. B., Dirksen A., Glynn J. R., Kremer K.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Emerg Infect Dis.* **9**: 1553-1557.
- Madigan M., Martinko J., Parker J.** Brock, *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall.
- Maggliozzo R. S., Marcinkeviciene J. A.** 1996. Evidence for isoniazid oxidation by oxypressors mycobacterial catalase-oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:11303-11304.
- Mahillon J. and Chandler M.** 1998. Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725–774.
- Man Kam K., Yip C. W., Tse L W., Wong K. L., Lam T. K., Kremer K., Kam Yan A. B., van Soolingen, D.** 2005. Utility of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing for Differentiating Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates of the Beijing Family *J. Clin. Microbiol.* **43**: 306-313.
- Martiel J. L., Blot M.** 2002. Transposable Elements and Fitness of Bacteria. *Theor. Popul. Biol.* **61**, 509–518.
- Mathema B., Kurepina N. E., Bifani P. J., Kreiswirth B.N.** 2006. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 658–685.
- McCray E., Weinbaum C., Braden C., Onorato I.** 1997. The Epidemiology of Tuberculosis in the United States. *Clin. Chest Med.* **18**: 99 – 113.

- McGrath J.W.** 1988. Social networks of disease spread in the lower Illinois valley: a simulation approach. *Am. J. Phys. Anthropol.* **77**: 483-96.
- Meier A., Sander P., Schaper K. J., Scholz M., Bottger E. C.** 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**: 2452-2454.
- Miranda J, Ríos R, Clavijo A, Chacón C, Mattar S.** 2006. Estudio preliminar de la susceptibilidad antimicrobiana y variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en un área del Caribe colombiano. *Coloma. Med.* **37**: 275-286.
- Mitchison D. A.** 1985. Mechanism of drug action in shortcourse chemotherapy. *Bulletin International Union Against Tuberculosis.* **65**:30-37.
- Moxon E.R. Wills C.** 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? *Sci. Am. Jan*: 72-77
- Morbidity and Mortality Weekly Report.** Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons: Florida and New York, 1988-1991. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1991. **40**:585-591.
- Morbidity and Mortality Weekly Report.** Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs Worldwide, 2000-2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2006. **55**: 301-305
- Munsiff S. S., Bassoff T., Nivin B., Li J., Sharma A., Bifani P., Mathema B., Driscoll J., Kreiswirth B. N.** 2002. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1230-1238.
- Neyra J.** Imágenes Históricas de la Medicina Peruana. UNMSM, Fondo Editorial, 1997.
- Niemann S., Richter E., Rüsche-Gerdes, S.** 1999. Letters to editor. The IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism in Particular Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Evolve Too Fast for Reliable Use in Outbreak Investigation. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3078-3079.
- Niemann S., Richter E., Rüsche-Gerdes S., Schlaak M., Greinert U.** 2000. Double Infection with a Resistant and a Multidrug-Resistant strain of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 548-551.
- Otal I., Samper S., Asensio M. P., Vitoria M. A., Rubio M. C., Gomez-Lus R., Martin C.** 1997. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 273-7.
- Ovchinnikov Y. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Lipkin V. M., Sverdlov E. D., Kiver I. F., Bass I.A., Mindlin S. Z., Danilevskaya O. N., Khesin R. B.** 1981. Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the β -subunit gene of rifampicin resistant *rpoB255* mutant. *Mol. Gen. Genet.* **84**: 536-538.
- Pai M., Gokhale K., Joshi R., Dogra S., Kalantri S., Mendiratta D. K., Narang P., Daley C. L., Granich R.M., Mazurek G. H., Reingold A. L., Riley L.W., Colford J. M.** 2005. *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India—Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA.* **293**: 2746-2750.
- Palomino J., Cardoso S., Ritacco V.** 2007. Tuberculosis 2007, from Basic science to patient care. . [Online.] www.TuberculosisTextbook.com.
- Pearson M. L., Jereb J. A., Frieden T. R., Crawford J. T., Davis B. J., Dooley S. W., Jarvis W. R.** 1992. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a risk to patients and health care workers. *Ann. Intern. Med.* **117**:191-6.

- Perú, Ministerio de Salud.** 2006. Construyendo alianzas estratégicas para detener la tuberculosis: La experiencia peruana. Lima: MINSA/ DGSP.
- Pillay M. and Sturm A. W.** 2007. Evolution of the Extensively Drug-Resistant F15/LAM4/KZN Strain of *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clin. Infect. Dis.* **45**: 1409–1414.
- Pitaksajjakul P., Wongwit W., Punprasit W., Eampokalap B., Peacock S., Ramasoota P.** 2005. Mutations in the gyrA and gyrB genes of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from TB patients in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **36**:228-37.
- Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, Butler W. R.; Eisenach K. D.; Cave M. D.; Shinnick T. M.** 1993. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1537-1542.
- Poulet S., and Cole S.T.** 1995. Characterisation of the polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Microbiol.* **163**: 87–95.
- Prod'hom G, Guilhot C, Gutierrez MC, Varnerot A, Gicquel B, Vincent V.** 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J Clin Microbiol.* **35**:3331-3334.
- Radman, M.** 1999. Enzymes of evolutionary change. *Nature* **401**: 866–869.
- Rastoggi N., Goh K. S., Labrousse V.** 1992. Activity of clarithromycin compared with those of other drugs against *Mycobacterium paratuberculosis* and further enhancement of its extracellular and intracellular activities by ethambutol. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36**:2843-2846.
- Rastogi, N., Legrand, E., Sola C.** 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech.* **20**: 21-54.
- Rattan A., Kalia A., Ahmad N.** 1998. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 195–209.
- Raviglione M. C., Snider D. E. Jr, Kochi A.** 2006. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA.* **273**: 220–226.
- Robertson B.D., and Meyer T.F.** 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends. Genet.* **8**: 422–427.
- Rodriguez H., Snow E. T., Bhat U., Loechler E. L.** 1992. An *Escherichia coli* plasmid-based, mutational system in which supF mutants are selectable Insertion elements dominate the spontaneous spectra. *Mutation Res.* **270**: 219–231.
- Rosemberg, J.** 1999. Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação; *Bol. Pneumologia Sanitária.* **7**: 5-29.
- Rosensweig, Brahm.** 1999. Diagnosing an enigmatic Pharaoh. CTVglobemedia, Discovery Chanel. [Online.] <http://exn.ca/egypt/Rulers.cfm>.
- Ross B.C., Raios K., Jackson K., Dwyer B.** 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 942–946.
- Rouse D. A., Devito J. A., Li Z., Byer M., Morris S. L.** 1996. Site directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol. Microbiol.* **22**: 583-592.

- Sagrada Biblia. Nacar-Colunga. Biblioteca de Autores Cristianos. Edición 1- Impresión 57, 2007. Deuteronomio 28: 22
- Salo W. L., Aufderheide A. C., Buikstrat J., Holcomb T. A.** 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **91**: 2091-2094.
- Samper S., Iglesias M. J., Rabanaque M. J., Gómez L. I., Lafoz M. C., Jiménez M. S., Ortega A., Lezcano M. A., Van Soolingen D., Martín C., and The Spanish Working Group on MDR-TB.** 2005. Systematic Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Spain. *J Clin Microbiol.* **43**: 1220-1227.
- Sampson S. L., Warren R. M., Richardson M., Victor T. C., Jordaan A. M., van der Spuy G. D., van Helden P. D.** 2003. IS6110-Mediated Deletion Polymorphism in the Direct Repeat Region of Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **185**: 2856-2866.
- Schneider D., Duperchy E., Coursange E., Lenski R. E., Blot M.** 2000. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics.* **156**: 477-488.
- Scorpio A., Zhang Y.** 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **2**: 662-667.
- Shoeb H. A., Bowman B. U. Jr, Ottolenghi A. C., Merola A. J.** 1985. Peroxidase-mediated oxidation of isoniazid. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **27**:399-403.
- Small P. M., Shafer R. W., Hopewell P. C., Singh S. P., Murphy M. J., Desmond E., Sierra M. F., Schoolnik G. K.** 1993. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N. Engl. J. Med.* **328**: 1137-1144.
- Sociedad Peruana de Tisiología.** Revista de Tuberculosis. Edición Enero, 1941. Lima-Perú. (Publicación Científica Año I, Número 1)
- Sociedad Peruana de Tisiología.** Revista de Tuberculosis. Edición Enero-Junio, 1952. Lima-Perú. (Publicación Científica Año XII, Número 34)
- Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S., Musser J.M.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 9869-9874.
- Takayama K., Kilburn J. O.** 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**: 1493-1499.
- Telenti A., Philipp W. J., Sreevatsan S., Bernasconi C., Stockbauer K. E., Weiles B, Musser J. M., Jacobs W. R. Jr.** 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.* **3**: 567-570.
- The new enciclopædia Britannica, Ready reference, Micropædia. 15th Edition. USA. Enciclopædia Britannica, inc., 1995. Vol. 2. pp 1768
- Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B.** 1990 Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* **28**: 2668-2673.
- Treves D. S., Manning S., and Adams J.** 1998. Repeated evolution of an acetate-crossfeeding polymorphism in long-term populations of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 789-797.

- van Belkum A., Scherer S., van Alphen L., Verbrugh H.** 1998. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 275–293.
- van Soolingen D., de Haas P., Hermans P., Groenen P., van Embden J.** 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1985–1995.
- van Soolingen D., Qian L., De Haas P. E., Douglas J. T., Traore H., Portaels F., Huang Zi Qing, Enkhsaikan D., Nymadawa P., van Embden J. D. A.** 1995. Predominance of a single genotype of *M. tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol.* **33**: 3234–3238.
- van Soolingen D., Borgdorff M. W., de Haas P. E. W., Sebek M. M. G. G., Veen J., Dessens M., Kremer K., van Embden J. D. A.** 1999. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in the Netherlands: A Nationwide Study from 1993 through 1997. *J. Infect. Dis.* **180**:726–736.
- van Embden J D, Cave M D, Crawford J T, Dale J W, Eisenach K D, Gicquel B, Hermans P., Martin C., Mcadam R., Shinnick T. M., Small P. M.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 406–409.
- van Embden J D, Schouls L M, Kamerbeek J, inventors.** 2000. De Staat der Nederlanden, Vertegenwoordigd door de Minister van Welzijn, Volksgezondheden en Cultuur, titular. Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by direct variant repeat oligotyping. US patent 6,074,820. Jun 13.
- Van Rie A., Enarson D.** 2006. XDR tuberculosis: an indicator of public-health negligence. *Lancet.* **368**: 1554–1556
- Wayne L. G.** 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **109**:147–151.
- World Health Organization.** 1997. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1994 – 1997. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization.** 1999. Guidelines for the Prevention of Tuberculosis in Health Care Facilities in Resource-Limited Settings. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization^a.** 2006. Tuberculosis. Fact sheet 2006. World Health Organization, Geneva, Switzerland. [Online.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/index.html>.
- World Health Organization^b.** 2006. Biorisk management, Laboratory biosecurity guidance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** 2007. Countries with XDR-TB Confirmed cases to date. WHO 2007. WHO Stop TB Department.
- World Health Organization.** 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Fourth Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002–2007. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yang Z. H., De Haas P. E. W., Wachmann C. H., Van Soolingen D., Van Embden J. D. A., Andersen Å. B.** 1995. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Denmark in 1992. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2077–2081.
- Zapater, J.** 1871. Opúsculo sobre la influencia del Clima del Valle de Jauja. Lima-Perú. Tip. De L. J. Tola, por J. Ravanal-Lampa núm 215.

Zhang, Y. 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 529-564.

Comunicaciones personales

Instituto Pedro Kouri, Cuba

Comunicación personal con **Raúl Díaz**, Instituto Pedro Kouri de Cuba, 22 de Enero del 2007: Sobre los posibles resultados prácticos dentro de la epidemiología molecular de la tuberculosis

Comunicación personal con **Raúl Díaz**, 15 de Abril del 2008: Discusión sobre el tiempo promedio de estabilidad de un patrón genotípico de las secuencias IS6110 y sobre la evolución de la droga resistencia en *M. tuberculosis*.

Comunicación personal con **Ernesto Montoro**, 30 de abril del 2008: Definición del concepto Multidrogorresistencia asociada a resistencia a drogas de segunda línea.

Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria Oswaldo Cruz Institute, Brasil

Comunicación personal con **Phillip Suffys**, 5 de Noviembre del 2007: Sobre los análisis estadísticos en epidemiología de la tuberculosis.

L'Institut IMAG, Francia

Comunicación personal con **Jean Louis Martiel**, 13 de Febrero del 2008: Sobre la relación fitness-evolución dentro de los estudios de las secuencias de inserción y su posible vinculación con la drogorresistencia.

National Jewish Health, Estados Unidos

Comunicación personal con **Michael Iseman**, 30 de abril del 2008: Definición del concepto MDR plus.

Instituto de Medicina Tropical de Bélgica

Comunicación personal con **Leen Rigouts**, 25 de Mayo del 2007: Discusión sobre los primeros resultados de la técnica de genotipaje basado en PCR-

Anexos

Anexo 1

Preparación de Soluciones

1. Solución TE (Tris 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l)

Pesar 1.0g de Tris-base y 372 de EDTA disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8 y completar el volumen a un litro con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Almacenar a 4 °C.

2. NaOH 10N/l

Pesar 0,04 g NaOH y disolver en 100 ml de agua destilada

3. Buffer TAE 50X

Pesar 24,2 g de Tris Base, 1,8612 g de EDTA di Na. 2H₂O. Disolver en 57,1 ml de ácido acético glacial, completar el volumen hasta 100 ml con agua bidestilada (H₂O_{dd}). Ajustar el buffer a un pH 8. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

4. Buffer TAE 1X

Disolver 10 ml de buffer TAE 50X en 500ml de H₂O_{dd}

5. Buffer de carga para ADN 2X

Pesar 0,05g de SDS, 0,0447g de EDTA y 0,005g de Azul deBromofenol disolver 2.5 ml de glicerol, completar el volumen a 10 ml con H₂O_{dd}. Ajustar a un pH 8.

6. Solución de los desoxinucleótidos tifosfatados a 0.2 mM

Tomar 10 µl de cada dNTP (soluciones de dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 100 mM) y añadir 360 µl de agua destilada. Guardar en alícuotas a -20 °C.

Anexo 2

Definiciones básicas de los conceptos estadísticos e interpretaciones.

Análisis discriminante

El Análisis Discriminante es un método estadístico cuya finalidad es analizar si existen diferencias significativas entre grupos de objetos respecto a un conjunto de variables medidas sobre los mismos. En el caso de que existan, explicar en qué sentido se dan y proporcionar procedimientos de clasificación sistemática de nuevas observaciones de origen desconocido en uno de los grupos analizados.

Objetivo General

Clasificar individuos u objetos en grupos mutuamente excluyentes, previamente establecidos, llevando en cuenta los valores observados de un conjunto de variables independientes.

Objetivo Especifico

Analizar si existen diferencias entre los grupos en cuanto a su comportamiento con respecto a las variables consideradas y averiguar en qué sentido se dan dichas diferencias.

Elaborar procedimientos de clasificación sistemática de individuos de origen desconocido, en uno de los grupos analizados.

Odds ratio

Existe otra manera de representar la probabilidad de ocurrencia de un evento y es mediante el cociente entre la probabilidad de que ocurra el evento y la probabilidad de que no ocurra. Este cociente, que en inglés se denomina odds y para el que no hay una traducción española comúnmente aceptada, indica cuanto más probable es la ocurrencia del evento que su no ocurrencia.

El *odds ratio* (OR) es el cociente entre el odds en el grupo con el factor y el odds en el grupo sin el factor.

A partir de la tabla en la que en la columna nF figuran los eventos (“casos”: a_0) y los “no casos” (b_0) en la categoría que no tiene el factor y en la columna F los de la categoría que sí tiene el factor

	nF	F
Casos	a_0	a_1
No casos	b_0	b_1
Total	n_0	n_1

El OR se calcula

$$OR = \frac{\hat{odds}_1}{\hat{odds}_0} = \frac{\frac{\hat{R}_1}{1 - \hat{R}_1}}{\frac{\hat{R}_0}{1 - \hat{R}_0}} = \frac{\frac{\frac{a_1}{n_1}}{\frac{b_1}{n_1}}}{\frac{\frac{a_0}{n_0}}{\frac{b_0}{n_0}}} = \frac{a_1 \times b_0}{a_0 \times b_1}$$

Características

- no tiene dimensiones.
- rango de 0 a ∞ .
- $OR=1$ si no hay asociación entre la presencia del factor y el evento.
- $OR>1$ si la asociación es positiva, es decir si la presencia del factor se asocia a mayor ocurrencia del evento y $OR<1$ si la asociación es negativa.

Riesgo relativo

En epidemiología se denomina riesgo a la probabilidad de ocurrencia de un evento, típicamente enfermar, aunque también morir, curar, etc. (en la terminología anglosajona se usan los términos risk y hazard, este último especialmente si el evento es morir).

Se define el riesgo como la probabilidad de que un individuo, libre de enfermedad y susceptible de ella, la desarrolle en un periodo determinado, condicionada a que el individuo no muera a causa de otra enfermedad durante el periodo.

La incidencia acumulada es un estimador de esta definición de riesgo, mientras que la prevalencia es un estimador de otra posible definición de riesgo: probabilidad de que un individuo de una determinada población tenga una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado.

En ambos casos se usa el cociente entre el riesgo en el grupo con el factor y el riesgo en el grupo de referencia como índice de asociación y se denomina riesgo relativo (RR).

En la tabla se representan esquemáticamente los resultados de un estudio que permita evaluar el RR, en la columna nF figuran los eventos (“casos”: a_0) y los “no casos” (b_0) en la categoría que no tiene el factor y en la columna F los de la categoría que sí tiene el factor

	nF	F
Casos	a_0	a_1
No casos	b_0	b_1
Total	n_0	n_1

A partir de la tabla

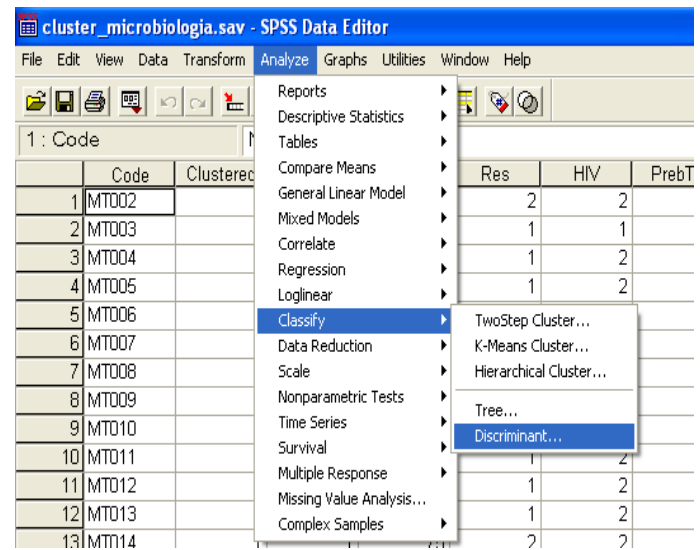
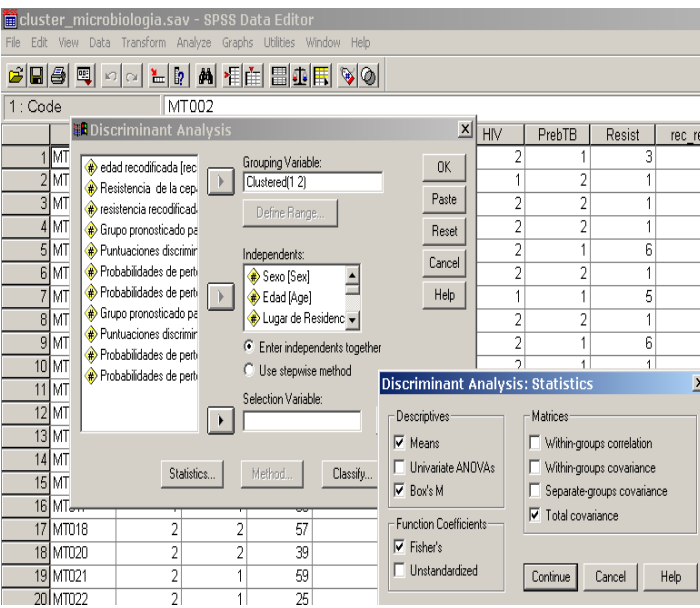
$$RR = \frac{\hat{R}_1}{\hat{R}_0} = \frac{a_1/n_1}{a_0/n_0}$$

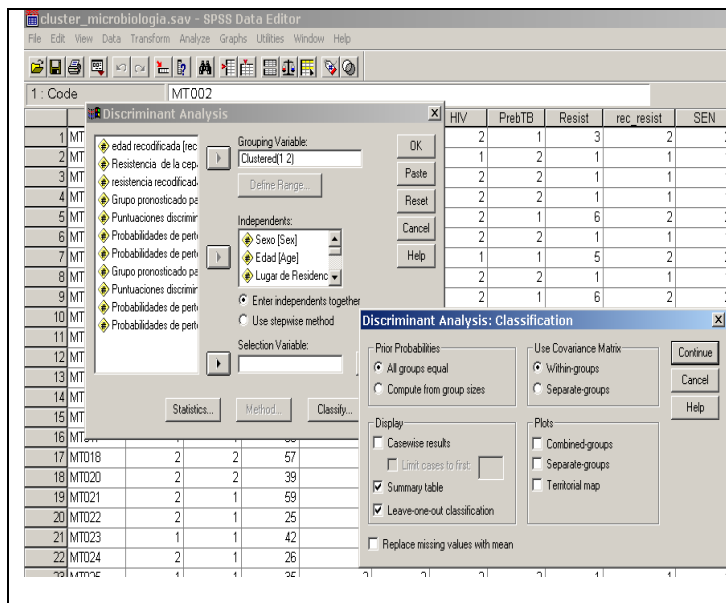
Características

- no tiene dimensiones.
- Rango de 0 a ∞
- $RR=1$ si no hay asociación entre la presencia del factor y el evento.
- $RR > 1$ si la asociación es positiva, es decir si la presencia del factor se asocia a mayor ocurrencia del evento y $RR < 1$ si la asociación es negativa

Obtención de resultados en SPSS

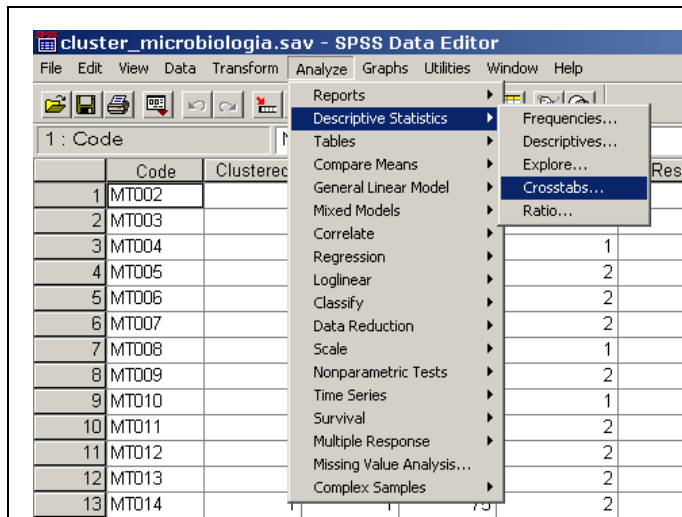
Análisis discriminante

	<p><i>1er paso</i></p> <p><i>Análisis → classify → Discriminante</i></p>
	<p><i>2do paso</i></p> <p><i>En grouping variable se coloca la variable que determina los grupos, y en independents las variables que se desea clasificar en los grupos determinados. los grupos se definen en Define Range de 1 a 2.</i></p> <p><i>En Statistics - Seleccionar en el cuadro los estadísticos necesarios para el análisis.</i></p>

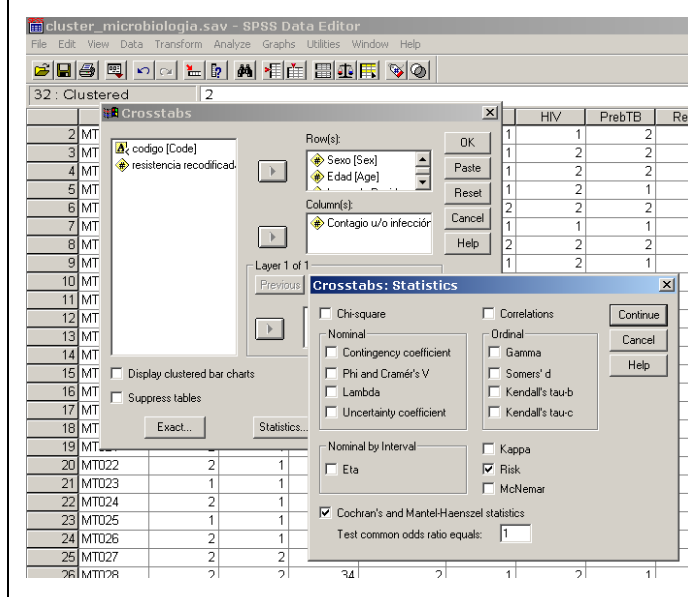


*En classify
Seleccionar **Summary table** el
cual indica la tabla de
clasificación.*

Odds Ratio – Riesgo Relativo



*En analyze → statistic
descriptive → crosstabs*



*En columna se ingresa la
variable que determina la
incidencia, en las filas, y en las
filas las variables en las que se
desea determinar el riesgo.*

*En la opción **Statistics**
seleccionar **Risk**.*

Anexo 3.**Lugares y Posiciones de los primers IS1 e IS2a lo largo del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

IS1 5'-CGGACTCACCGGGGCGGTTCA

Distance From 5' End (bp)	% Match	Strand
890354	100%	→
1997434	100%	→
2366747	100%	→
2551347	100%	→
2636910	100%	→
2973442	100%	→
3552563	100%	→
3554046	100%	→
3711715	100%	→
3892112	100%	→
616454	100%	←
1290988	100%	←
1626897	100%	←
1981395	100%	←
2423809	100%	←
2869560	100%	←

IS2 5'-CGGACATGCCGGGCGGTTCA

Distance From 5' End (bp)	% Match	Strand
1543285	100%	→
1989036	100%	→
2431450	100%	→
2785948	100%	→
3121857	100%	→
3796391	100%	→
520733	100%	←
701130	100%	←
858799	100%	←
860282	100%	←
1439403	100%	←
1775935	100%	←
1861498	100%	←
2046098	100%	←
2415411	100%	←
3522491	100%	←

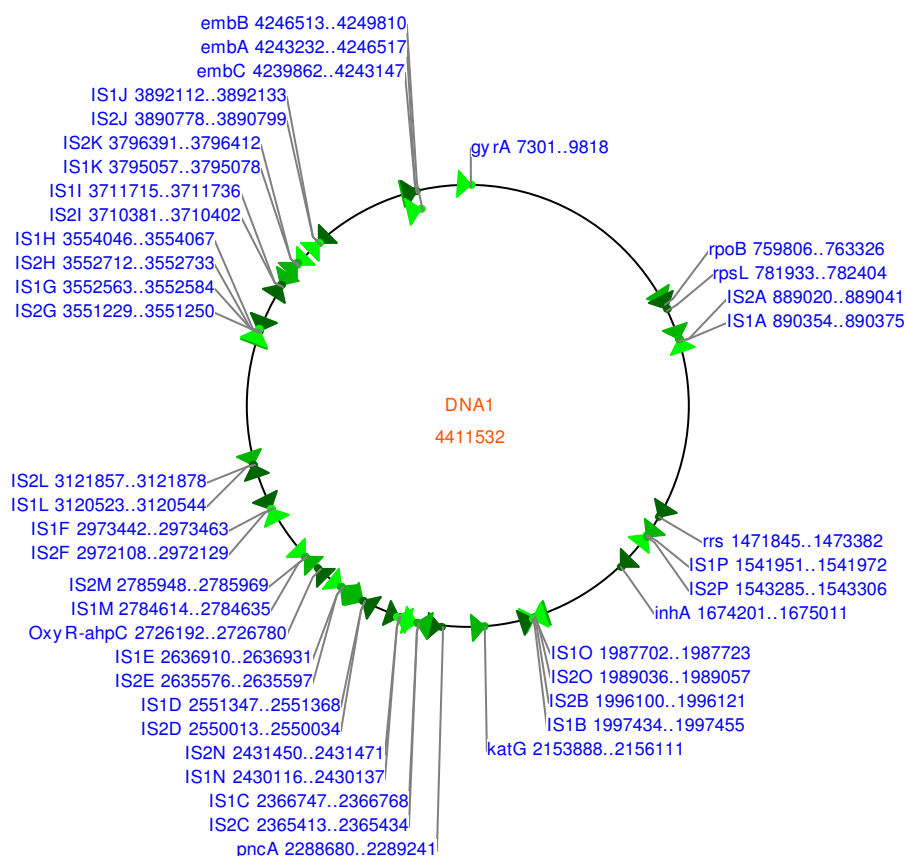


Figura 22. Sitios de hibridación de los primers IS1 e IS2 sobre el genoma H37Rv de *M. tuberculosis*. Se observan las posiciones de los primers IS1 e IS2 a lo largo del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, además de los lugares donde se encuentran los genes implicados en la resistencia de antibióticos

Anexo 4.**Lugares y Posiciones del primer Mtb2 lo largo del genoma de Mycobacterium tuberculosis H37Rv**

Mtb2 5'-CGGCGGCAACGGCGGC

Distance From 5' End (bp)	% Match	Strand
361995	100%	→
362397	100%	→
837943	100%	→
837952	100%	→
839391	100%	→
839400	100%	→
839481	100%	→
840726	100%	→
926364	100%	→
927498	100%	→
1091598	100%	→
1212098	100%	→
1212791	100%	→
1216896	100%	→
2922272	100%	→
2923091	100%	→
3163313	100%	→
3779022	100%	→
3779904	100%	→
3779913	100%	→
3802104	100%	→
3802374	100%	→
3802830	100%	→
3927191	100%	→
3927287	100%	→
3928283	100%	→
3928292	100%	→
3928301	100%	→
3928310	100%	→
3928319	100%	→
3928328	100%	→
3929090	100%	→
3929177	100%	→

3929267	100%	→
3929954	100%	→
3930260	100%	→
3930305	100%	→
3930503	100%	→
3930653	100%	→
3933529	100%	→
3933835	100%	→
3934132	100%	→
3934438	100%	→
3935107	100%	→
3935722	100%	→
3936508	100%	→
3940545	100%	→
3940833	100%	→
3941232	100%	→
3941241	100%	→
3941568	100%	→
3941577	100%	→
3941914	100%	→
3941923	100%	→
3942556	100%	→
3942724	100%	→
3942793	100%	→
3943282	100%	→
3943705	100%	→
3943777	100%	→
3943786	100%	→
3943849	100%	→
3943867	100%	→
3944269	100%	→
374084	100%	←
379909	100%	←
669873	100%	←
670602	100%	←
670611	100%	←
670758	100%	←

670833	100%	←
670953	100%	←
671418	100%	←
671529	100%	←
671538	100%	←
671706	100%	←
671715	100%	←
672183	100%	←
672225	100%	←
672279	100%	←
672297	100%	←
672636	100%	←
672645	100%	←
672762	100%	←
672882	100%	←
672891	100%	←
672960	100%	←
673053	100%	←
673489	100%	←
673498	100%	←
673756	100%	←
674257	100%	←
674413	100%	←
1606657	100%	←
1608691	100%	←
1609969	100%	←
1615064	100%	←
1615589	100%	←
1615898	100%	←
1987887	100%	←
2054257	100%	←
2322418	100%	←
2322766	100%	←
2322889	100%	←
2350249	100%	←
2365274	100%	←
2366345	100%	←

2420283	100%	←
2420292	100%	←
2421597	100%	←
2755263	100%	←
2755299	100%	←
2774877	100%	←
2778728	100%	←
2779376	100%	←
2779406	100%	←
2779616	100%	←
2792732	100%	←
2792948	100%	←
2793104	100%	←
3025271	100%	←
3026222	100%	←
3026291	100%	←
3222823	100%	←
3222934	100%	←
3222943	100%	←
3222988	100%	←
3222997	100%	←
3442877	100%	←
3442886	100%	←
3482537	100%	←
3482729	100%	←
3483533	100%	←
3737466	100%	←
3737475	100%	←
3738099	100%	←
3738189	100%	←
3738198	100%	←
3738300	100%	←
3738309	100%	←
3738360	100%	←
3738369	100%	←
3738423	100%	←
4072917	100%	←

4073676	100%	←
4074012	100%	←
4074549	100%	←
4074873	100%	←
4075680	100%	←
4075698	100%	←
4077928	100%	←
4221235	100%	←

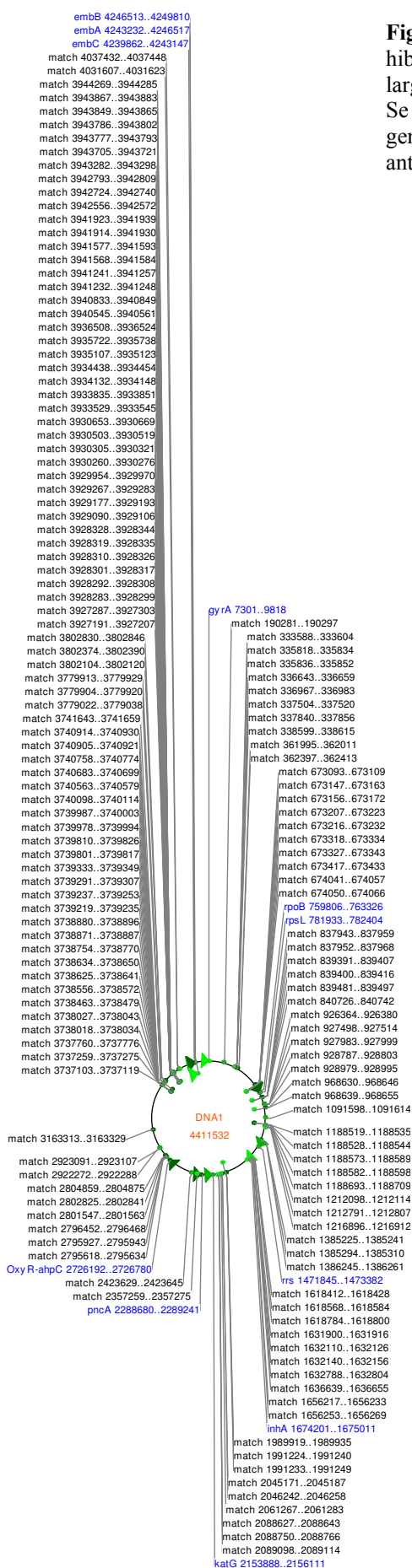


Figura 23. Son las posiciones de hibridización del primer Mtb2 a lo largo del genoma de *M. tuberculosis*. Se observan también la posición de genes implicados en la resistencia a antibióticos.